

JP99/03351

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 13 AUG 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 6月24日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第214720号

出願人
Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所

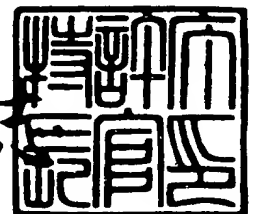
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 7月15日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山佐 建



出証番号 出証特平11-3050172

【書類名】 特許願

【整理番号】 P10-J241

【提出日】 平成10年 6月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 新規ヘモポエチン受容体蛋白質

【請求項の数】 17

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 野村 仁

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

 【氏名】 前田 正嗣

【特許出願人】

 【識別番号】 596102791

 【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2

 【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

 【代表者】 大杉 義征

 【電話番号】 0298-30-6211

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ヘモポエチン受容体蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 に示す 1 位のアミノ酸 Met から 361 位のアミノ酸 Ser までのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 2】 配列番号：3 に示す 1 位のアミノ酸 Met から 144 位のアミノ酸 Leu までのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 3】 配列番号：5 に示す 1 位のアミノ酸 Met から 237 位のアミノ酸 Ser までのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 4】 配列番号：7 に示す 1 位のアミノ酸 Met から 538 位のアミノ酸 Ser までのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項 5】 配列番号：2 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質。

【請求項 6】 配列番号：4 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質。

【請求項 7】 配列番号：6 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質。

【請求項 8】 配列番号：8 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードする蛋白質。

【請求項 9】 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとから成る融合蛋白質。

【請求項 10】 請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 11】 請求項 10 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 12】 請求項 10 に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 13】 請求項 12 に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質の製造方法。

【請求項 14】 請求項 1～9 に記載の蛋白質に結合する物質をスクリーニングする方法であって、

(a) 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程

(b) 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に結合する活性を有する物質を選択する工程、を含む方法。

【請求項 15】 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体。

【請求項 16】 請求項 15 に記載の抗体と、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、前記抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んで成る該蛋白質の検出又は測定方法。

【請求項 17】 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 及び配列番号：8 のいずれか一つに記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードする遺伝子、それらの製造方法及びその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

種々の細胞の増殖分化、あるいは分化成熟した細胞の機能の賦活化さらには細胞死に關与する体液性因子として数多くのサイトカインの存在が知られている。これらのサイトカインにはそれぞれ特異的な受容体が存在し、これらの受容体は構造上の類似性から幾つかのファミリーに分類されている⁽¹⁾。

一方受容体間の類似性と比較するとサイトカイン同士的一次構造上の相同性は低く、同一の受容体ファミリーに属するサイトカインメンバーの間でさえアミノ酸レベルでの顕著な相同性は認められない。この事は個々のサイトカインの機能の特異性を説明すると同時に、個々のサイトカインにより誘導される細胞の反応の類似性を説明する。

【0003】

上記サイトカイン受容体ファミリーの代表的なものとして、チロシンキナーゼ受容体、ヘモポエチン受容体、腫瘍壊死因子(TNF)受容体、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)受容体の各ファミリーが挙げられ、それぞれのファミリーで異なるシグナル伝達系の関与が報告されている。これらの受容体ファミリーのうち、特にヘモポエチン受容体ファミリーの多くは血液細胞あるいは免疫担当細胞に発現しており、そのリガンドであるサイトカインはしばしば造血因子あるいはインターロイキンと称される。これら造血因子、あるいはインターロイキン類のあるものは流血中に存在し全身的な造血あるいは免疫機能の体液性調節に關与していると考えられる。

【0004】

この事は他のファミリーに対応するサイトカインがしばしば局所での調節にのみ關与していると考えられる点とは対照的で、これらヘモポエチン類の一部のものはホルモン様因子と捉える事が可能であり、また逆に代表的なペプチド性ホルモンである成長ホルモン、プロラクチンあるいはレプチンの受容体もヘモポエチン受容体ファミリーに属する。上記ホルモン様の全身性調節様式からこれらのヘモポエチン類を投与する事による種々の疾患の治療への応用が期待される。

事実数多いサイトカイン類の中で臨床応用が行われているのは、エリスロポエチン、G-CSF、GM-CSF、IL-2であり、また現在臨床応用に向けた検討が行われている、IL11、LIF、IL12に加えて上記ペプチドホルモ

ン類の成長ホルモン、プロラクチンを併せて考えると、上記各種受容体ファミリーのうちヘモポエチン受容体に結合する新規サイトカインを探索する事により、より高い確率で臨床応用可能なサイトカインを見出す事が可能と考えられる。

【0005】

上に述べた様にサイトカイン受容体はファミリーメンバー間で構造上の類似性を有している。この類似性を利用して新規受容体を発見する試みは数多く行われており、特にチロシンキナーゼ受容体に関してはその触媒部位に高度に保存された配列を利用して既に数多くの受容体がクローニングされている⁽²⁾。これに対してヘモポエチン受容体はその細胞質領域にチロシンキナーゼの様な酵素活性ドメインを有しておらず、そのシグナル伝達は細胞質中に遊離状態で存在する別のチロシンキナーゼ蛋白との会合を介して行われる事が知られている。

これらの細胞質性チロシンキナーゼ(JAKキナーゼ)との受容体上の結合部位はファミリーメンバー間で一応保存されているものの、その相同性はあまり高くない⁽³⁾。一方これらヘモポエチン受容体を最もよく特徴付ける配列はむしろ細胞外領域に存在し、特にTrp-Ser-Xaa-Trp-Ser(Xaaは任意のアミノ酸)の5アミノ酸から成るモチーフは殆ど全てのヘモポエチン受容体に保存されており、この配列を利用した新規ファミリーメンバーの探索により新規受容体を取得する事が期待される。事実これまでにIL11受容体⁽⁴⁾、レプチン受容体⁽⁵⁾及びIL13受容体⁽⁶⁾が本アプローチにより同定されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

我々もこれまでに、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフをコードするオリゴヌクレオチドをプローブに用いてブランクハイブリダイゼーションあるいはRT-PCR等の方法により新規受容体の探索を試行してきた。しかしこのモチーフをコードするオリゴヌクレオチドtgag(t/c)nnntggag(t/c)(nは任意の塩基)が15塩基対と短い事、さらにはg/c含量が高い等の理由から通常のハイブリダイゼーションの実験条件下で厳密に15塩基が完全にハイブリダイズしたものだけを選別する事は極めて困難であった。

【0007】

また比較的広範に分布しかつ発現量も高いと考えられる各種コラーゲンを初めとするヘモポエチン受容体以外の蛋白をコードするcDNA中にも類似の配列が含まれており、これらの原因により上記ブランクハイブリダイゼーションあるいはRT-PCRによるスクリーニングは極めて効率の悪いものであった。

従って本発明は、新規ヘモポエチン受容体蛋白質、それをコードするDNAを提供する。本発明はまた、該DNAが挿入されたベクター、該DNAを保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法を提供する。本発明はさらに、該蛋白質に結合する物質のスクリーニング方法を提供する。

【0008】

【課題を解決するための手段】

これらの問題を解決するべく、また実際ヒトゲノム上に幾つの異なるヘモポエチン受容体遺伝子が存在するのかを推定する目的で、上記Trp-Ser-Xa-a-Trp-Serモチーフをコードする全ての可能なオリゴヌクレオチド配列をプローブとしてコンピュータ上で個々のプローブと完全に一致する配列の検索を実施した。

次に上記検索でヒットしたクローンのうちヒトゲノム由来クローン（コスミド、BAC、PAC）について、プローブ配列周辺の塩基配列をアミノ酸配列に変換して既知のヘモポエチン受容体のアミノ酸配列と比較する事により、ヘモポエチン受容体ファミリーメンバーをコードすると考えられる遺伝子を選別した。

【0009】

以上の検索により2個のヘモポエチン受容体遺伝子と考えられるクローンを同定した。このうち1個は既知のGM-CSFベータ受容体遺伝子（第22染色体22q12.3-13.2領域由来）でありもう1個（第16染色体16p12領域由来BACクローンAC002303）は新規ヘモポエチン受容体をコードすると推測され、この遺伝子を「NR8」と命名した。

次に、得られた塩基配列をもとにしてデザインされた特異的なプライマーを利用したRT-PCRによりNR8をコードすると考えられるcDNAをヒト胎児肝細胞cDNAライブラリー中に見いだした。さらに、このcDNAライブラリ

ーを鋳型に5' -、3' -RACE法を行う事により最終的に361アミノ酸からなる細胞膜貫通型受容体をコードする完全長cDNA、NR8- α を得た。

【0010】

NR8- α は一次構造上、細胞外領域に他のファミリーメンバー間で保存されているシステイン残基、プロリンに富んだモチーフ、細胞内領域にシグナル伝達に関与すると考えられるbox1モチーフ、等がよく保存されており典型的なヘモポエチン受容体と考えられた。

【0011】

したがって、本発明は、(1) 配列番号：1に示す1位のアミノ酸Metから361位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質を提供する。

本発明はまた、(2) 配列番号：3に示す1位のアミノ酸Metから144位のアミノ酸Leuまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質を提供する。

本発明はまた、(3) 配列番号：5に示す1位のアミノ酸Metから237位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質を提供する。

【0012】

本発明はまた、(4) 配列番号：7に示す1位のアミノ酸Metから538位のアミノ酸Serまでのアミノ酸配列からなる蛋白質、又は該蛋白質中のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなる蛋白質を提供する。

本発明はまた、(5) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質を提供する。

本発明はまた、(6) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAとハイブ

リダイズするDNAがコードする蛋白質を提供する。

本発明はまた、(7) 配列番号：6に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質を提供する。

本発明はまた、(8) 配列番号：8に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードする蛋白質を提供する。

本発明はまた、(9) 上記(1)～(8)のいずれか1つに記載の蛋白質と他のペプチド又はポリペプチドとから成る融合蛋白質を提供する。

【0013】

本発明はまた、(10) 上記(1)～(9)のいずれか1つに記載の蛋白質をコードするDNAを提供する。

本発明はまた、(11) 上記(10)に記載のDNAが挿入されたベクターを提供する。

本発明はまた、(12) 上記(10)に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体を提供する。

本発明はまた、(13) 上記(12)に記載の形質転換体を培養する工程を含む、上記(1)～(9)のいずれか1つに記載の蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、(14) 上記(1)～(8)に記載の蛋白質に結合する物質をスクリーニングする方法であって、

(a) 上記(1)～(9)のいずれか1つに記載の蛋白質に被験試料を接触させる工程、

(b) 上記(1)～(9)のいずれか1つに記載の蛋白質に結合する活性を有する物質を選択する工程、を含む方法を提供する。

【0014】

本発明はまた、(15) 上記(1)～(8)のいずれか1つに記載の蛋白質に対して特異的に結合する抗体を提供する。

本発明はまた、(16) 上記(15)に記載の抗体と、上記(1)～(9)のいずれか1つに記載の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、前記抗体と該蛋白質との免疫複合体の生成を検出又は測定することを含んで成る該蛋白質の検出又は測定方法を提供する。

本発明はまた、(17) 配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 及び配列番号：8 のいずれか一つに記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA を提供する。

【0015】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規ヘモポエチン受容体蛋白質に関する。本発明の蛋白質に含まれる「NR8」と命名された蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5 及び配列番号：7 に示し、該蛋白質をコードする cDNA の塩基配列を配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 及び配列番号：8 に示す。本発明のヘモポエチン受容体蛋白質の生物学的活性とは、造血因子受容体蛋白質活性である。

【0016】

本発明の蛋白質をコードする遺伝子又はその cDNA は、本明細書に記載のプロープを用いヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングして得ることができる。

得られた cDNA 又は cDNA 断片をプロープとして、さらに cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより異なる細胞、組織、臓器又は種から遺伝子を得ることができる。cDNA ライブラリーは、例えば Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNA ライブラリーを用いてもよい。

【0017】

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られた cDNA をプロープとしてジェノミック DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ジェノミック DNA を単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Bioch

emistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia)等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia)を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【0018】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプローブを用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

【0019】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認すればよい。

また、本発明のDNAは、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い配列を設計することができる(Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, 43-47)。また、本発明のDNAを市販のキットや公知の方法によって改

変することができる。例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン（ATG）及び／又は終始コドン（ATT、TGA又はTAG）の挿入等が挙げられる。

本発明のDNAは、具体的には配列番号：2の塩基配列において441位の塩基Aから1523位の塩基CからなるDNA、配列番号：4の塩基配列において441位のAから872位の塩基AからなるDNA、配列番号：6の塩基配列において659位の塩基Aから1368位の塩基CからなるDNA及び配列番号：8の塩基配列において441位の塩基Aから2054位の塩基CからなるDNAを包含する。

【0020】

本発明のDNAはまた、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6及び配列番号：8のいずれかに示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ本発明の蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質をコードするDNA含む。

ストリンジェントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2×SSC、0.1%SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、2×SSC及び0.1%SDSが挙げられる。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAを得ることができる。

上記のハイブリダイズするDNAは好ましくは天然由来のDNA、例えばcDNA又は染色体DNAであってよい。

【0021】

実施例に示すごとく、本発明の蛋白質をコードするcDNAとハイブリダイズする遺伝子のmRNAは、ヒトの種々の組織にも分布していることが判明した。従って、上記の天然由来のDNAは、例えば実施例において本発明の蛋白質をコードするcDNAとハイブリダイズするmRNAが検出される組織由来のcDNAやジェノミックDNAであってもよい。また、本発明の蛋白質をコードするD

NAは、cDNAやジェノミックDNAの他、合成DNAであってもよい。

【0022】

本発明の蛋白質を製造するには、得られたDNAを発現制御領域、例えばエンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現可能なように発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、蛋白質を発現させる

具体的には次のようにすればよい。哺乳類細胞を使用する場合、常用される有用なプロモーター／エンハンサー、本発明の蛋白質をコードするDNA、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターを構築する。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げることができる。

【0023】

また、その他に蛋白質発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) の哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1 α プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【0024】

大腸菌を使用する場合、常用される有用なプロモーター、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列、発現させる遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Ward

らの方法 (Nature (1988) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。

【0025】

複製開始点としては、SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

【0026】

本発明の蛋白質を製造するための発現ベクターは、本発明に好適に使用される発現ベクターであればいかなる発現ベクターであってよい。本発明の発現ベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター、例えばpEF、pCDM8、昆虫細胞由来の発現ベクター、例えばpBacPAK8、植物由来の発現ベクター、例えばpMH1、pMH2、動物ウイルス由来の発現ベクター、例えばpHSV、pMV、pAdexLcw、レトロウイルス由来の発現ベクター。例えばpZIpneo、酵母由来の発現ベクター、例えばpNV11、SP-Q01、枯草菌由来の発現ベクター、例えばpPL608、pKTH50、大腸菌由来の発現ベクター、例えばpQE、pGEAPP、pGEMEAPP、pMALp2が挙げられる。

本発明のベクターは、in vivo、in vitroで本発明の蛋白質を製造するのみならず、哺乳動物、例えばヒトの遺伝子治療に用いることもできる。

上述のように構築された本発明の発現ベクターの宿主への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 (Virology (1973) 52, 456-467) やエレクトロポレーション法 (EMBO J. (1982) 1, 841-845) 等が用いられる。

本発明において、蛋白質の製造のために、任意の産生系を使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【0027】

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えばCHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えばsf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特にDHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。

【0028】

植物細胞としては、Nicotiana tabacum由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えばサッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えばアスペルギウス属 (Aspergillus) 属、例えばアスペルギウス・ニガー (Aspergillus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

【0029】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30～40℃で約15～200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0030】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0031】

例えば、目的とするDNAをヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。このDNAが挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から蛋白質を得る。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。（Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

【0032】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場

合、目的とするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の蛋白質を得る (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON530に挿入し、このベクターをAgrobacterium tumefaciensのようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばNicotiana tabacumに感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【0033】

本発明はまた、本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質も包含する。このような蛋白質を得るための方法としては、蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入する方法が用いられている。このような蛋白質を得るために、例えば合成オリゴヌクレオチドプライマーを利用した部位特異的変異誘発法により、所望の変異を導入することができる (Kramer, W. and Fritz, H. J. Methods in Enzymol. (1987) 154, 350-367)、又はPCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL製) を使用することができる。これらの方法により、配列番号1、2、3又は4に示されたアミノ酸配列からなる蛋白質において、その生物学的活性に影響を与えないよう、1若しくは複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾された、本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることができる。

【0034】

本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質としては、具体的には、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5及び配列番号：7のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する蛋白質の他、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5及び配列番号：7のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が欠失したものの、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5及び配列番号：7のいずれか

に示されるアミノ酸配列に1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が付加したもの、配列番号:1、配列番号:3、配列番号:5及び配列番号:7のいずれかに示されるアミノ酸配列中の1又は2個以上、好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものが挙げられる。

【0035】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666, Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500, Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433, Dalbadié-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

例えば、本発明の蛋白質に1又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質として、融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、本発明の蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に包含される。融合蛋白質を作製する方法は、本発明の蛋白質をコードするDNAと他のペプチド又は蛋白質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

例えば、ペプチドとしては、FLAG (Hopp, T. P. et al., Bio Technology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗原の断片、Ick tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断

片等、すでに公知であるペプチドが使用される。また蛋白質としては、例えば GST (グルタチオン・S・トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらをコードする DNA を融合させたものを用いることができる。

本発明の蛋白質はまた、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6 及び配列番号：8 のいずれかに示される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA によりコードされており、且つ本発明の蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を含む。

【0036】

また、本発明には蛋白質の生物学的活性を有し、且つ配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5 及び配列番号：7 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する蛋白質と同一性を有する蛋白質も含まれる。同一性を有する蛋白質とは、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5 及び配列番号：7 のいずれかに示されるアミノ酸配列と、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 90%、さらに好ましくは少なくとも 95% 以上、アミノ酸配列上の同一性を有する蛋白質を意味する。蛋白質の同一性を決定するには、Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730 に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0037】

本発明の蛋白質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態が異なっている。しかしながら、得られた蛋白質が本発明の蛋白質と機能的に同等の活性を有するものである限り、本発明に含まれる。蛋白質と機能的に同等の活性としては、本発明のヘモポエチン受容体蛋白質と機能的に同等のヘモポエチン受容体蛋白質活性を有していることを意味する。

例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が付加される。また、真核細胞

、例えば哺乳動物細胞で発現させた場合、N末端のシグナル配列は除去される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。

例えば、Von Heijne, G. *Nucleic Acids Research* (1986) 14, 4683-4690に記載の方法に基づいて、本発明の蛋白質を解析した結果、シグナル配列は配列番号：1のアミノ酸配列において、1位のMetから19位のGlyまでと推定された。したがって、本発明は配列番号：1に記載のアミノ酸配列において、20位のCysから361位のSerまでからなる蛋白質を包含する。

【0038】

本発明はまた、配列番号：1、配列番号：3、配列番号：5及び配列番号：7のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる蛋白質の活性中心からなる部分ペプチドを含む。本発明の蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質の分子のうち、疎水性プロット解析から推定される疎水性領域や親水性領域の1つあるいは複数の領域を含む部分ペプチドが挙げられる。これらの部分ペプチドは1つの疎水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよいし、1つの親水性領域の一部あるいは全部を含んでいてもよい。例えば、本発明の蛋白質の可溶性蛋白質や細胞外領域からなる蛋白質も本発明に包含される。

【0039】

本発明の蛋白質の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

【0040】

上記で得られた本発明の蛋白質は、細胞内外、宿主から単離し実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を

分離、精製することができる。

【0041】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼが用いられる。

【0042】

本発明の蛋白質は、スクリーニング方法に使用されるために有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する物質を含むと予想される被験試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する物質を選択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する物質をスクリーニングする方法において使用される。本発明の蛋白質に結合する活性を有する物質を選択する方法としては、当業者に通常用いられる多くの方法を使用することができる。

【0043】

これらのスクリーニング方法に用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。また、本発明の蛋白質に結合する活性を有する物質とは、結合活性を有する蛋白質であってもよく、あるいは結合活性を有する化学合成された化合物であってもよい。

本発明の蛋白質と結合する蛋白質のスクリーニング方法は、例えばウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していると予想される細胞、組織、臓器より cDNA を単離し、これをファージベクター、例えば λ gt11、ZAPII 等へ導入して cDNA ライブラリーを作製し、これを培地を引いたプレート上で発現させ、フィルターに発現させた蛋白質を固定し、標識して精製した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するプラークを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

【0044】

本発明において提供されるスクリーニング系の一つの具体例は、細胞を用いた two-hybrid system (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行うことができる。

本発明の蛋白質とヘテロダイマーからなる転写調節因子の一方のサブユニットとの融合蛋白質をコードする DNA を含む発現ベクター及び被験試料として所望の cDNA とヘテロダイマーからなる転写調節因子のもう一方のサブユニットをコードする DNA を連結してなる DNA を含む発現ベクターを細胞に導入して発現させ、本発明の蛋白質に cDNA がコードする蛋白質が結合して該転写調節因子がヘテロダイマーを形成した場合、あらかじめ細胞内に構築したレポーター遺伝子が発現するような two-hybrid system を用いることができる。本発明の蛋白質に結合する蛋白質が存在した場合、レポーター遺伝子の発現量を検出／又は測定することにより蛋白質を選択することができる。

【0045】

具体的には、次のようにすればよい。すなわち、本発明の蛋白質をコードする DNA と LexA の DNA 結合ドメインをコードする遺伝子とをフレームが一致

するように連結し、発現ベクターを作製する。次に、所望の cDNA と GAL4 転写活性化ドメインをコードする遺伝子とを連結せしめることにより発現ベクターを作製する。

LexA 結合モチーフが存在するプロモーターにより転写が調節される HIS3 遺伝子を組み込んだ細胞を上記の two-hybrid system 発現プラスミドを用いて形質転換した後、ヒスチジン不含合成培地上でインキュベートするとタンパクの相互作用が認められたときのみ細胞の生育が観察される。このように、形質転換体の生育程度によりレポーター遺伝子の発現量の増加を調べることができる。

レポーター遺伝子としては、HIS3 遺伝子の他、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type 1) 遺伝子等を用いることができる。

two-hybrid system は通常用いられている方法により構築してもよいし、市販のキットを用いてもよい。市販の two-hybrid system のキットとしては、MATCHMARKER Two-Hybrid System、Mammalian MATCHMARKER Two-Hybrid Assay Kit (いずれも CLONTECH 製)、HybridZAP Two-Hybrid Vector System (Stratagene 製) が挙げられる。

【0046】

本発明において提供されるスクリーニング方法は、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うことができる。すなわち、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被験試料を適用する。この場合の被験試料としては、細胞の培養上清、細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被験試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合した蛋白質を得ることができる。

【0047】

本発明のスクリーニング方法で使用される被験試料としては、例えばペプチド、精製若しくは粗精製タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、微生物発

酵生産物、海洋生物抽出液、植物抽出液、細胞抽出液、動物組織抽出液が挙げられる。これらの被験試料は新規な物質であってもよいし、公知の物質であってもよい。

【0048】

本発明のスクリーニング方法によって単離される物質は、本発明の蛋白質の活性を促進又は阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明の蛋白質に結合する活性を有する物質の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質に含まれる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる物質をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合、常用される手段に従って実施することができる。

【0049】

例えば必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば本発明の蛋白質と結合活性を有する物質を生理学的に認められる単体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤とともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0050】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムの様な結合剤、結晶性セルロースの様な賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸の様な膨化剤、ステアリン酸マグネシウムの様な潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンの様な甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液

状単体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油のような天然産出植物油を溶解又は懸濁させるの通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0051】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0052】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

本発明の蛋白質と結合活性を有する物質の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0053】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0054】

本発明の抗体は、公知の手段を用いてモノクローナル抗体又はポリクローナル

抗体として得ることができる。

本発明の蛋白質に対して特異的に結合する抗体は、蛋白質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、本発明の蛋白質に対して特異的に結合するモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

例えば、抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

【0055】

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、本明細書に記載された全ての蛋白質の生物学的活性を有する蛋白質を使用できる。また、蛋白質の部分ペプチドも用いることができる。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば蛋白質のアミノ基（N）末端断片やカルボキシ（C）末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に特異的に反応する抗体を意味する。

【0056】

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入して本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞内外又は、宿主から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得、この蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物とし

ては、例えばサルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0057】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与し、以降フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0058】

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としてポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離してもよい。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞が挙げられる。

【0059】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法 (Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

【0060】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常数日～数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0061】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球を*in vitro*で蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688）。

【0062】

さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO92-03918、WO93-2227、WO94-02602、WO94-25585、WO96-33735およびWO96-34096参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（*oncogene*）により不死化させた細胞を用いてもよい。

【0063】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in t

he United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照)。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【0064】

本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合するかぎり、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)(Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる(例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousscaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

【0065】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0066】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法（Enzyme-linked immunosorbent assay；ELISA）等により行うことができる。

【0067】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えばアルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーション、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore（Pharmacia製）を使用することができる。

【0068】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、前記抗体と蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することから成る本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。

本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定するこ

とができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

【0069】

本発明は、配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6及び配列番号：8のいずれか一つに示される塩基配列からなるDNAまたは該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAを包含する。すなわち、本発明の蛋白質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと選択的にハイブリダイズし得るプローブ、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム等が含まれる。

【0070】

本発明は、例えば配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6及び配列番号：8のいずれか一つに示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：2、配列番号：4、配列番号：6及び配列番号：8のいずれか一つに示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0071】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0072】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA又はmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に選択的に安定にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

選択的に安定にハイブリダイズするとは、通常のハイブリダイゼーション条件

下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他の蛋白質をコードするDNAとクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAとしては、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有するものを示す。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明の蛋白質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

【0073】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

【0074】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0075】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応

じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1～100mg/kg好ましくは0.1～50mg/kgの範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、したがって本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌタレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性、を抑制することが可能である点で有用である。

【0076】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0077】

材料及び方法

1) 2段階Blast検索

Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフをコードするオリゴヌクレオチドとしてtgga g(t/c)nnntgga g(t/c)(nは任意の塩基)からなる256通りのプローブ配列をデザインした。この配列によりEPO受容体、TPO受容体及びマウスIL6受容体を除く殆ど全ての既知ヘモポエチン受容体が検出可能である。個々の配列をqueryとしてGenBankのnrデータベースをBlastN(Advanced BlastN2.0.4)プログラムを用いて検索した。検索のパラメータはExpect値を100とした以外はdefault値(Descriptions=100、Alignments=100)を用いた。

【0078】

この一次検索の結果約500個のプローブ配列と完全にマッチするクローンが得られたので、このうちヒトゲノム由来クローン(コスミド、BAC及びPAC)について、プローブ配列をほぼ中央に含む180塩基の配列を切り出した。次にこの180塩基からなる配列をqueryとしてBlastX(Advanced BlastX2.0.4)プログラムを用いて再度nrデータベースを検索する事により、プローブ配列周辺のアミノ酸配列の既知ヘモポエチン受容体と

の相同性を検索した。

検索のパラメータは通常 *Expect* 値を100とした以外は *default* 値を用いたが、しばしば極めて多数のヒット（高度反復配列である *Alu* サブファミリーに起因）が得られた場合に既知ヘモポエチン受容体へのヒットを観測する事が困難であった事から、この様な場合は感度を最大限とする為、*Expect* =1000、*Descriptions* =500、*Alignments* =500の値を用いた。

【0079】

2次検索で1個以上の既知ヘモポエチン受容体にヒットしたクローンについてさらにヒットが *Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser* モチーフの読み枠と一致している事、さらに *query* 配列中に *in frame* の終止コドンが存在しない事の確認を行いこれらの条件に合致しないものは除外した。なお上記検索条件の妥当性は予め既知ヘモポエチン受容体である *EPO* 受容体と *G-CSF* 受容体を陽性対照として確認した。

さらに *Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser* モチーフを含むエクソンに隣接するエクソンを検索する目的で、2次検索の *query* 配列を中心に5'、3' 両方向に順次180塩基の配列を切り取って *query* として上記条件にて *BLASTX* 検索を実施した。この検索によりさらに5'側と3'側に存在するエクソンの部分配列を検出した。得られた配列は次項で述べる *RT-PCR* のプライマーのデザインに供した。

【0080】

2) *RT-PCR* による *NR8* 発現組織の検索

NR8 発現組織の同定を目的に、上記 *BAC* クローン *AC002303* の配列内において、既知サイトカインレセプターにアミノ酸翻訳レベルで、広く保存されている複数の *Exon* 領域を予測し、その予測した *Exon* 領域の配列上に以下のプライマーを合成した（各プライマーの位置は図5参照）。

NR8-SN1; 5'- CCG GCT CCC CCT TTC AAC GTG ACT GTG ACC -3' (配列番号: 9)
 NR8-SN2; 5'- GGC AAG CTT CAG TAT GAG CTG CAG TAC AGG -3' (配列番号: 10)
 NR8-AS1; 5'- ACC CTC TGA CTG GGT CTG AAA GAT GAC CGG -3' (配列番号: 11)
 NR8-AS2; 5'- CAT GGG CCC TGC CCG CAC CTG CAG CTC ATA -3' (配列番号: 12)

【0081】

Human Fetal Multiple Tissue cDNA Panel (Clontech #K1425-1) を鋳型として用いて、上記プライマーの組合わせによるRT-PCRを試みた。PCRにはAdvantage cDNA Polymerase Mix (Clontech #8417-1) を用い、Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 サーマルサイクラーを使用し、下記の実験条件にて実施した。

PCR 条件	94 deg.C, 4 min	
94 deg.C, 20 sec	72 deg.C, 3 min	← 5 cycles
94 deg.C, 20 sec	70 deg.C, 3 min	← 5 cycles
94 deg.C, 20 sec	68 deg.C, 3 min	← 28 cycles
72 deg.C, 4 min		
4 deg.C, stop		

【0082】

得られたPCR産物を、pGEM-T Easy vector (Promega #A1360) にサブクローニングし、塩基配列を決定した。PCR産物のpGEM-T Easy vectorへの組換えは、T4 DNA Ligase (Promega #A1360) によって、4 deg. C/12 hourの反応をおこなった。PCR産物とpGEM-T Easy vectorの遺伝子組換え体は、大腸菌株DH5a (Toyobo #DNA-903) を形質転換することによって得られた。

また、遺伝子組換え体の選別には、Insert Check Ready (

Toyobo#PIK-101)を用いた。さらに、塩基配列の決定には、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI/PerkinElmer#4303141)を使用し、ABI PRISM377DNA Sequencerによって解析をおこなった。独立する10クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した結果、全クローンともに単一の塩基配列を示した。この得られた配列が、NR8の部分塩基配列である事を確認した。


【0083】

3) 5' -及び3' -RACE法による完全長cDNAクローニング

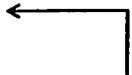
3-1) 5' -RACE法

NR8の全長cDNAを単離するために、前記のNR8-AS1 Primerを一次PCRに用い、また、NR8-AS2 Primerを二次PCRに用いて5' RACE-PCRを試みた。鋳型としてHuman Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Library (Clontech#7403-1)を用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。Perkin Elmer Gene Amp PCR System2400サーマルサイクラーを使用し、下記のPCR条件で行った結果、選択的スプライシングによる二種類のサイズを示すPCR産物が得られた。

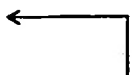
1. st PCR 94 deg. C, 4 min

94 deg. C, 20 sec ←  5 cycles

72 deg. C, 4 min

94 deg. C, 20 sec ←  5 cycles

70 deg. C, 4 min


94 deg. C, 20 sec ←  28 cycles

68 deg. C, 4 min

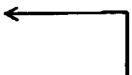
72 deg. C, 4 min

4 deg. C, stop

2. nd PCR 94 deg. C, 4 min

94 deg. C, 20 sec ←  5 cycles

70 deg. C, 3 min 30 sec

94 deg. C, 20 sec ←  28 cycles

68 deg. C, 3 min 30 sec

72 deg. C, 4 min

4 deg. C, stop

【0084】

得られた二種類のPCR産物は双方とも、前記同様、pGEM-T Easy vectorにサブクローニングし、独立する16クロンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定には前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。その結果、塩基対の長さ、及び配列の相違により、14クロンと2クロンの二種類のグループに区別することができた。これは、選択的スプライシングに起因する産物の相違であり、独立する14クロンのグループはゲノム配列に相関するExon 5を含み、残る独立した2ク

ローンのグループにはExon 5が含まれていないことを、塩基配列の解析によって確認した。

【0085】

3-2) 3' - RACE法

NR8の全長cDNAを単離するために、前記のNR8-SN1 Primerを一次PCRに用い、また、NR8-SN2 Primer二次PCRに用いて3' RACE-PCRを試みた。鋳型として5' RACE-PCR同様、Human Fetal Liver Marathon-Ready cDNA Libraryを用い、PCR実験にはAdvantage cDNA Polymerase Mixを使用した。PCR条件は前記、3-1) に示した通りで行った結果、シングルバンドのPCR産物が得られた。

得られたPCR産物を、前記同様、pGEM-T Easy vectorにサブクローニングし、独立する12クローンの遺伝子組換え体に対し、全インサート断片の塩基配列を決定した。塩基配列の決定は、前記同様、dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Kitを使用し、ABI PRISM 377 DNA Sequencerによって解析をおこなった。この結果、独立した全12クローンともに単一の塩基配列を示した。この3' RACE-PCRの結果、決定した塩基配列と、前述の5' RACE-PCRの結果により決定した塩基配列とを総合することによって、NR8の全長cDNAの塩基配列を決定した。

【0086】

4) Northern Blotting

各ヒト臓器、及びヒト癌細胞株におけるNR8の遺伝子発現分布、及び、遺伝子発現様態を解析するために、前述までのPCRによって得られた全てのcDNAクローンをプローブとして用い、Northern Analysisを行った。プローブの調製は、Mega Prime Kit (Amersham, cat #RPN1607) を使用し [α-32P] dCTP (Amersham, cat #AA0005) によって標識し、5' RACE-PCR産物のプローブ断片と、3' RACE-PCR産物のプローブ断片が、モル比で均等になるよ

う混合した。

Northern Blot はHuman Multiple Tissue Northern (MTN) Blot (Clontech#7760-1), Human MTN Blot IV (Clontech#7766-1), Human Cancer Cell Line MTN Blot (Clontech#7757-1) を用いた。HybridizationはExpress Hyb Hybridization Solution (Clontech#8015-2) を使用した。

【0087】

Hybridizationの条件は68deg. C/30min. のPre-hybridizationの後、68deg. C/14hoursのHybridizationを実施した。下記の条件にて洗浄をおこなった後、Imaging Plate (FUJI#BAS-III) に露光し、Image Analyzer (FUJIX, BAS-2000II) によって、NR8 mRNAの遺伝子発現を検出した。

- 洗浄条件
- (1) 1x SSC / 0.1% SDS, for 5 min at R.T.
 - (2) 1x SSC / 0.1% SDS, for 30 min at 50 deg.C
 - (3) 0.1x SSC / 0.1% SDS, for 30 min at 50 deg.C

結果

【0088】

256通りのプローブ配列をqueryとしたBlastN検索の結果1998年5月30日の時点で約500のヒットが得られた。このうちヒトゲノム由来のクローン(コスミド、BAC、PAC)は約1/3を占めた。このうち28のクローンがBlastXによる2次検索の結果1個以上の既知ヘモポエチン受容体をヒットした(表1)。

【表1】

さらにこの28クローンのうち4クローン(AC002303、AC003112、AL008637及びAC004004)は複数個の既知ヘモポエチン受容体をヒットしたがAC004004はTrp-Ser-Xaa-Trp-Se

rモチーフの3アミノ酸下流に終止コドンが存在している事から除外した。残る3クローンのうちAL008637は既知受容体であるGM-CSF受容体 β と考えられた。AC002303はTIGRグループにより1997年6月19日に登録されたヒト第16染色体16p12領域由来のBACクローンCIT987-SKA-670B5であり全長131530塩基対からなる。

【0088】

図1に示す様にAC002303配列中唯一存在するプローブ配列、tggagtgaatggagt(40952-40966)を含む40861-41040の180塩基をqueryとしたBlastX検索によりTPO受容体、レプチン受容体を初めとする多数のヘモポエチン受容体が明らかな相同性を示したがquery配列と完全に一致する既知ヘモポエチン受容体はデータベースに登録されていなかった。また、上記180塩基の配列を中心に5'、3'両方向に180塩基ずつBlastXスキャンを実施した結果さらに2つの既知ヘモポエチン受容体と相同性を示す配列を39181-39360及び42301-42480の領域に見出し同一遺伝子の他のエクソンと考えられた(図2)。

39181-39360の部位にはPro-richモチーフPAPPF、42301-42480の部位にはBox1モチーフが保存されていた。Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフを含むエクソンに隣接する3'側エクソンは細胞膜貫通ドメインが載っているが、このドメインは他のヘモポエチン受容体との相同性が低くBlastXスキャンでは検出されなかった。以上の結果より上記BACクローンCIT987-SKA-670B5に新規ヘモポエチン受容体遺伝子が存在する可能性が示唆された。

【0089】

ヘモポエチン受容体の幾つかについては偽遺伝子の存在が報告されている(7・8)。NR8が偽遺伝子でない事を確認する目的でNR8遺伝子の転写産物の検索をRT-PCR法にて実施した。図5に示したプライマーの位置から、SN1/AS1、SN1/AS2、SN2/AS1、SN2/AS2の組み合わせでそれぞれ、330bp、258bp、234bp、162bpのサイズのバンドの増幅が期待される。ヒト胎児肝、脳、骨格筋cDNAを鋳型として検討した結

果、胎児肝についてのみそれぞれのプライマーの組み合わせで予想されたサイズの明瞭なバンドが観察された(図3)。

これに対して胎児脳cDNAでは全く増幅を認めず、胎児骨格筋では約650bpのバンドと400-500bpのブロードなバンドが観察された。しかし胎児骨格筋の場合のバンドのサイズは異なる組み合わせのプライマーを用いた場合でも一定であった事から何らかの理由による非特異的な増幅と考えられた。次にこの胎児肝由来cDNAを用いて完全長cDNAを得るべく、5'-RACE、3'-RACE法を実施した(図4)。

【0090】

5'-RACE、3'-RACEでそれぞれ増幅された断片(約1.1kbと1.2kb)の塩基配列を解析した結果、それぞれの断片は互いに約260bp重複して5'側、3'側に伸びた配列でNR8 mRNAのほぼ全長を含むと考えられた事からこれを連結して全長cDNA(NR8 α)とした(図5)。

図5に示す様に、NR8 α cDNAのORFは塩基番号441から始まるMetが39bp上流のin frame終止コドンの存在から開始コドンと考えられ、塩基番号1524から始まる2個の終止コドンで終了する。N末端側から順に、典型的な分泌シグナル配列、他のヘモポエチン受容体メンバーに保存されたCys残基を含むリガンド結合部位と考えられるドメイン、Pro-richなモチーフ、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフ、細胞膜貫通ドメイン、シグナル伝達に関与すると考えられるBox1モチーフ等のヘモポエチン受容体の特徴を備えている。以上の結果から、NR8遺伝子は新規なヘモポエチン受容体をコードしているものと考えられた。

【0091】

RACE法で増幅された断片を解析した結果スプライス変異体の存在が示唆された。塩基配列解析の結果、この変異体は上記NR8 α のPro-richモチーフを含む約150bpを欠失している事が明らかとなった。さらにAC002303の配列とNR8 α との比較からエクソン・イントロンの類推を行った結果(表2)、上記変異体は表2中の第5エクソンをオルタナティブスプライシングにより欠失しているものと考えられた。

【表2】

この変異体 (NR8 β) は第4エクソンに第6エクソンが直結してフレームシフトが起こり *truncated form* の可溶性受容体をコードする事が可能である。またエクソンとイントロンの境界は殆どの場合コンセンサス配列をとっているが、唯一第9エクソン (Exon 9a) と第9イントロンの境界だけ *acc/acggag* とコンセンサス配列 (*nag/gtgagt* 等) とは異なっている。従って、今回の検討では mRNA として確認できていないが、この部位でのスプライシングが起こらないと仮定した場合の配列 (Exon 9b) も理論的に可能でありこの様な仮想クローンを NR8 γ とした。NR8 γ は NR8 α の C 末端近傍に 177 アミノ酸の挿入を含む蛋白をコードする。なお、NR8 β cDNA を図6に、NR8 γ cDNA を図7に示した。

【0092】

NR8 の各臓器に於ける発現を Northern Blotting により解析した結果を図8に示す。種々のサイズの mRNA が成人肺、脾臓、胸腺、骨格筋、脾臓、小腸、末梢白血球、子宮に検出された。さらに造血系細胞株を含む種々の細胞株についても同様に検討したところ、前骨髄性白血病細胞株である HL60 と パークットリンフォーマ由来 Raji の2株に於いて発現を認めた。

脾臓、胸腺、末梢白血球、肺及び上記白血病細胞株では 5 kb 及び 3-4 kb に2本の計3本のバンドが観察されたのに対して、骨格筋、小腸及び子宮では 2 kb、脾臓に於いては 1.2 kb の小さなサイズの mRNA の発現を認めそれぞれ分解産物あるいは非特異的な交差反応産物と考えられた。

【0093】

考察

2段階 Blast 検索により、新規ヘモポエチン受容体遺伝子を含むヒトゲノム配列を同定した。今回一次検索は全ての Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser をコードしうる 15塩基のオリゴヌクレオチド 256通りの配列を query として manual で実施した。予備検討の段階で query に要する手間を省く目的で tBlastN を用いたアミノ酸による query も検討したが、既知受容体配列による検討で 5 アミノ酸による query では感度を最大限に上げ

てもヒットは得られなかった。

Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフの両側を伸ばして検討したところ、ヒットを得る為には最小で8アミノ酸の長さが必要であった。Trp-Ser-Xaa-Trp-Serを含む8アミノ酸として全ての可能な場合の数は 20^4 となる事、またアミノ酸queryではSer残基のコドンとしてTCNのものも拾ってしまう事からオリゴヌクレオチドによるqueryの方が好ましいと考えられた。一次検索はdegenerateプローブを用いたブランクハイブリダイゼーションをコンピュータ上で実施した事に相当するが、当然の事ながら多くの偽陽性クローンをヒットする。

【0094】

今回の検索では15塩基の配列が完全に一致したもののみを選別したがそれでも約500の一次ヒットが得られた。偽陽性クローンの代表的なものとしてthrombospondin、collagen、semaphorin、Alu、逆転写酵素、補体成分、Notch、Tcell受容体があげられる。これらのうちの幾つかは実際のブランクハイブリダイゼーションでもしばしばヒットした偽陽性クローンである。500の一次ヒットの中にはEPO受容体、TPO受容体、マウスIL6受容体を除いた殆ど全ての既知ヘモポエチン受容体cDNAが含まれていた。

500の一次ヒットの約1/3に当たる157（うち14クローンは重複クローン）はヒトゲノム由来クローン（コスミド、BAC、PAC）で第2、8、10染色体を除く全ての染色体を網羅していた（表1）。これらのゲノム配列はその複雑性から完全に解析が為されていないのが現状であり従って未知の受容体を発掘する為の材料として適当と考えられた。

【0095】

また検索時点でのデータベースへのゲノム配列の総登録数及びこれらの登録に含まれる総塩基数が判れば、ヒト染色体当たりが存在するTrp-Ser-Xaa-Trp-Serをコードしうる配列数、さらには未知受容体を含めた総ヘモポエチン受容体数の推定が可能となる。仮にnrデータベース上のヒトゲノム配列が総ゲノムの5%をカバーしていると仮定すると、今回の検索で3つのヘモポ

エチン受容体遺伝子が検出された事から総ゲノム当たりでは60個のヘモポエチン受容体が存在すると推定される。

Blast Xによる2次検索はブランクハイブリダイセーションで得られた候補クローンがヘモポエチン受容体をコードしているか否かの判定の目的で行う相同性検索と同等である。ここで180塩基を切り取ってqueryとした理由は、既知のヘモポエチン受容体遺伝子の場合、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフを含むエクソンのサイズが通常この程度である事と、manual検索の場合GenBankレポートのフォーマットが1行60塩基である事による簡便性に由来する。

【0096】

図1及び図2に示した様に、Trp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフの位置はこのエクソンの中央より若干3'側にずれている事、及びこのエクソンの長さがヘモポエチン遺伝子毎に若干異なる事からquery配列の一部はイントロンを含む。しかしこの事は検索を行ううえでは支障とならない事は、今回実施した検索の感度で実際3つのヘモポエチン受容体遺伝子及びひとつの偽遺伝子と考えられるゲノム配列を検出した事から明らかである。

図9にNR8遺伝子の構造を模式的に示したが、NR8遺伝子の存在する領域はAluサブファミリーやMIRを初めとする反復配列で殆ど埋め尽くされており、これら反復配列の間のごく限られた隙間にNR8エクソンが点在する。この領域に分布する60個の反復配列のうち、唯一NR8第10エクソンの3'-UTRに(CA)nrepeatが存在する以外は他のエクソンとこれら反復配列との重なりは認められない(図9)。

NR8遺伝子の上記高密度反復配列の存在がGrailによるエクソンの検出や既知ヘモポエチン受容体との相同性の検出を阻害した可能性も充分考え得る。今回180塩基という短いquery配列を用いて小刻みな検索を行った事がこの様な反復配列に囲まれたエクソンを検出し得た理由と考える。

【0097】

もし同様な検索をより長い配列をqueryとして行ったならば隣接する反復配列に多数の配列がヒットして結果的にTrp-Ser-Xaa-Trp-Se

rモチーフを含む配列の検出は困難であったものと思われる。NR8の場合の様に高度反復配列が隣接する場合には有効な方法と考えられる。これら反復配列の生物学的意義は不明であるが、遺伝子の安定性は反復配列の存在により低下する可能性が考えられる。

今回の検索では一次検索で15塩基が完全に一致した配列のみを選別したが、既知のヘモポエチン受容体の中にはこのモチーフが一部崩れたもの（IL3受容体 α 、マウスIL12受容体p40、成長ホルモン受容体等）が存在する。

【0098】

また先に述べた様にEPO受容体、TPO受容体及びマウスIL6受容体の場合は2番目のSerはTCNのコドンによりコードされている為今回の検索対象からははずれる。特に後者の場合には予備的に2番目のSer残基に対するコドンをTCNとした配列で検索を実施したところ、多数のImmunoglobulin-like受容体（1997年度に多数の報告が見られる^{10, 11}）にヒットした。

Query配列に相当するアミノ酸配列はTrp-Ser-Xaa-Trp-Serモチーフではなく、異なるフレーム上にある(Val/Leu)-Glu-Leu-(Val/Leu)-Valモチーフであり、多数のメンバーからなるファミリーを形成している。今回の検索では実施できなかったが上記のコンセンサス配列からははずれるものの中にも有用な受容体が存在する可能性がある。

【0099】

5'-及び3'-RACEによる解析とNR8ゲノム配列の解析から少なくとも3種の異なるcDNA、NR8 α 、NR8 β 、NR8 γ の存在が予測された。このうちNR8 β は第5エクソンを欠いたオルタナティブスプライス産物であり、第4エクソンに直結してフレームシフトを起こして生じた第6エクソン上の終止コドンでCDSが終結する可溶性蛋白と第4エクソン上のATGから開始する、シグナル配列を欠いた膜結合蛋白の2種の異なる蛋白をコードする事が可能である。

このうち可溶性蛋白はNR8 α と第4エクソンまでは同じアミノ酸配列をとる事から可溶性受容体として機能する可能性がある。一方NR8 γ は仮想転写

物であり、NR8 α の第9エクソンと第9イントロンとの間の境界がコンセンサス配列と異なる事からこの部位でスプライシングが起こらない場合を想定すると、CDSは第9イントロンを読み進んで第10エクソンに *in frame* で接続する。

【0100】

その結果NR8 γ の第9エクソンは約1100塩基対となりNR8 α のC末端近傍に177アミノ酸の挿入を含む事になる。NR8 α とNR8 γ はともに細胞膜貫通型のヘモポエチン受容体をコードする。NR8 α 及びNR8 γ の細胞内ドメインにはシグナル伝達に関与すると考えられる他のヘモポエチン受容体間で保存されている配列のうちBox 1に似たモチーフが細胞膜近傍に存在する。Box 2についても保存度は低いながら類似の配列が存在する事から、NR8はホモ2量体でシグナルを伝達するタイプの受容体に属するものと考えられる。NR8が実際にリガンド依存性の増殖シグナルを伝達できるか、

またその場合にNR8 α とNR8 γ のどちらの受容体がその活性を有するかについては、それぞれの細胞内ドメインを既知ヘモポエチン受容体の細胞外ドメインと融合したキメラ受容体を作成して当該既知ヘモポエチンによるキメラ受容体導入造血因子依存性細胞株の増殖刺激活性を検討する事により確認可能と考えられる。

【0101】

Northern Blottingの結果、約5kb、3-4kb、2kb、1.2kbの位置に複数のバンドが種々の組織、細胞株に検出された。このうち2kbのバンドは骨格筋、小腸、子宮に於いてのみ観察されている。一方胎児骨格筋に於いて、RT-PCRの結果増幅されるバンドが検出されている(図3)。

しかし、同じRT-PCRに於いて胎児肝由来cDNAを鋳型とした場合には異なる位置のプライマーを用いた場合に予測される異なるサイズのバンドが観察されるのとは対照的に、同じ異なるプライマーの組み合わせで増幅されるバンドのサイズに変化は見られなかった。従って骨格筋の場合にはNR8とは異なる断片が増幅されたものと考えられ、骨格筋に於いてNR8と相同性を有する転写産

物が存在するものと考えられる。恐らく上記骨格筋で観察された2 kbのバンドはこのNR8と相同性を有する転写産物への交差ハイブリダイゼーションの結果と考えられ、小腸、子宮に於ける2 kbのバンドも同様と考えられた。

【0102】

一方1. 2 kbの短い転写産物は検討した組織では脾臓に於いてのみ検出された。NR8 α の転写開始点は図5の塩基番号1番よりさらに上流に存在すると考えられる事からNR8 α mRNAのサイズはpoly Aを含まないで1884塩基対よりも長い事が予想され、このバンドがNR8の転写産物であるとは考えにくい。脾臓は各種加水分解酵素の豊富な臓器である事から分解産物である可能性も否定できないが、恐らく骨格筋、小腸、子宮の場合と同じく交差ハイブリダイゼーションの結果と考えられる。

上記以外の組織（脾臓、胸腺、末梢白血球、肺）では5 kbと3-4 kbの領域に2-3本のバンドを認めた。細胞株についても同様なサイズのバンドをHL60とRajiに認め、他の癌細胞株（HeLa、SW480、A549、G361）及び白血病細胞株（K562、MOLT4）には全く発現を認めなかった。

以上の結果はNR8が造血細胞系、特に顆粒球系とB細胞系に特異的に発現している事を示唆する。5' -、3' -RACEの結果からは5' -、3' -UTRを含めた完全長のmRNAのサイズは予測できていない。恐らく上記のサイズの転写産物はこれらのUTRを含めた転写産物のサイズを反映しているものと考えられ、また異なるサイズの転写産物はスプライス変異体に対応するものと考えられる。

【0103】

NR8蛋白の医療への応用として、まずNR8が胎児肝、脾臓、胸腺及びある種の白血病細胞株に発現している事から未知の造血因子の受容体である可能性が示唆される。従ってNR8蛋白はこの未知の造血因子を得る為の有用な材料を提供するものと考えられる。

またNR8の発現はこれら造血組織中の限られた細胞集団に特異的に発現している可能性が想定され、この細胞集団を分離する手段として抗NR8抗体は有用

である。この様にして分離された細胞集団は細胞移植療法への応用が可能である。さらに抗NR 8抗体は白血病を初めとした疾患の病型診断あるいは治療への応用も期待される。一方、NR 8蛋白の細胞外ドメインを含む可溶性蛋白、あるいはNR 8のスプライス変異体であるNR 8 β はdecoy型受容体としてNR 8リガンドの阻害剤としての利用が想定され、NR 8が関与する白血病を初めとする疾患の治療への応用が期待できる。

【0104】

引用文献

- 1) Hilton D.J., in "Guidebook to Cytokines and Their Receptors" edited by Nicola N.A. (A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press), 1994, p8-16
- 2) Matthews W. et al., Cell, 1991, 65 (7) p1143-52
- 3) Murakami M. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1991, 88, 11349-11353
- 4) Robb, L. et al., J. Biol. Chem. 271 (23), 1996, 13754-13761
- 5) Gainsford T. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1996, 93 (25) p14564-8
- 6) Hilton D.J. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1996, 93 (1) p497-501
- 7) Kermouni, A. et al., Genomics 29 (2), 1995, 371-382
- 8) Fukunaga, R. and Nagata, S., Eur. J. Biochem., 1994, 220, 881-891
- 9) Lamerdin, J.E., et al., GenBank Report on AC003112, 1997
- 10) Cosman, D., et al., Immunity, 1997, In press
- 11) Wagtmann, N., et al., Curr. Biol. 7 (8), 1997, 615-618

【0105】

【発明の効果】

本発明により新規なヘモポエチン受容体蛋白質及びそれをコードするDNAが提供された。また、該DNAが挿入されたベクター、該DNAを保持する形質転換体、該形質転換体を利用した組換え蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質に結合する物質のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質は、造血作用に関連していると考えられ、造血作用の解明のための実験に有用である。

【配列表】

配列の長さ : 3 6 1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

[illegible]

175	180	185	
Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly			
190	195	200	
Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp			
205	210	215	
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn			
220	225	230	235
Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala			
240	245	250	
Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile			
255	260	265	
Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly			
270	275	280	
Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser			
285	290	295	
Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu			
300	305	310	315
Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr			
320	325	330	
Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val			
335	340	345	
Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser			
350	355	360	

【0107】

配列番号：2

配列の長さ：1884

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GGCAGCCAGC GGCCTCAGAC AGACCCACTG GCGTCTCTCT GCTGAGTGAC CGTAAGCTCG

60

CGGCTGGCC CTCTGCCTGC CTCTCCCTGA GTGTGGCTGA CAGCCACGCA GCTGTGTCTG	120
TCTGTCTGCG GCGCGTGCAT CCCTGCTGCG GCCGCTGGT ACCTTCCTTG CCGTCTCTTT	180
CCTCTGTCTG CTGCTCTGTG GGACACCTGC CTGGAGGCCC AGCTGCCCGT CATCAGAGTG	240
ACAGGTCTTA TGACAGCCTG ATTGGTGACT CGGGCTGGGT GTGGATTCTC ACCCCAGGCC	300
TCTGCCTGCT TTCTCAGACC CTCATCTGTC ACCCCCACGC TGAACCCAGC TGCCACCCCC	360
AGAAGCCCAT CAGACTGCCC CCAGCACACG GAATGGATTT CTGAGAAAGA AGCCGAAACA	420
GAAGGCCCGT GGGAGTCAGC ATG CCG CGT GGC TGG GCC GCC CCC TTG CTC CTG	473
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu	
1 5 10	
CTG CTG CTC CAG GGA GGC TGG GGC TGC CCC GAC CTC GTC TGC TAC ACC	521
Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr	
15 20 25	
GAT TAC CTC CAG ACG GTC ATC TGC ATC CTG GAA ATG TGG AAC CTC CAC	569
Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His	
30 35 40	
CCC AGC ACG CTC ACC CTT ACC TGG CAA GAC CAG TAT GAA GAG CTG AAG	617
Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys	
45 50 55	
GAC GAG GCC ACC TCC TGC AGC CTC CAC AGG TCG GCC CAC AAT GCC ACG	665
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr	
60 65 70 75	
CAT GCC ACC TAC ACC TGC CAC ATG GAT GTA TTC CAC TTC ATG GCC GAC	713
His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp	
80 85 90	
GAC ATT TTC AGT GTC AAC ATC ACA GAC CAG TCT GGC AAC TAC TCC CAG	761
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln	
95 100 105	
GAG TGT GGC AGC TTT CTC CTG GCT GAG AGC ATC AAG CCG GCT CCC CCT	809
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro	
110 115 120	
TTC AAC GTG ACT GTG ACC TTC TCA GGA CAG TAT AAT ATC TCC TGG CGC	857
Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg	
125 130 135	
TCA GAT TAC GAA GAC CCT GCC TTC TAC ATG CTG AAG GGC AAG CTT CAG	905
Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln	
140 145 150 155	

TAT GAG CTG CAG TAC AGG AAC CGG GGA GAC CCC TGG GCT GTG AGT CCG	953
Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro	
160 165 170	
AGG AGA AAG CTG ATC TCA GTG GAC TCA AGA AGT GTC TCC CTC CTC CCC	1001
Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro	
175 180 185	
CTG GAG TTC CGC AAA GAC TCG AGC TAT GAG CTG CAG GTG CGG GCA GGG	1049
Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly	
190 195 200	
CCC ATG CCT GGC TCC TCC TAC CAG GGG ACC TGG AGT GAA TGG AGT GAC	1097
Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp	
205 210 215	
CCG GTC ATC TTT CAG ACC CAG TCA GAG GAG TTA AAG GAA GGC TGG AAC	1145
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn	
220 225 230 235	
CCT CAC CTG CTG CTT CTC CTC CTG CTT GTC ATA GTC TTC ATT CCT GCC	1193
Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala	
240 245 250	
TTC TGG AGC CTG AAG ACC CAT CCA TTG TGG AGG CTA TGG AAG AAG ATA	1241
Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile	
255 260 265	
TGG GCC GTC CCC AGC CCT GAG CGG TTC TTC ATG CCC CTG TAC AAG GGC	1289
Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly	
270 275 280	
TGC AGC GGA GAC TTC AAG AAA TGG GTG GGT GCA CCC TTC ACT GGC TCC	1337
Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser	
285 290 295	
AGC CTG GAG CTG GGA CCC TGG AGC CCA GAG GTG CCC TCC ACC CTG GAG	1385
Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu	
300 305 310 315	
GTG TAC AGC TGC CAC CCA CCC AGC AGC CCT GTG GAG TGT GAC TTC ACC	1433
Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr	
320 325 330	
AGC CCC GGG GAC GAA GGA CCC CCC CGG AGC TAC CTC CGC CAG TGG GTG	1481
Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val	
335 340 345	

GTC ATT CCT CCG CCA CTT TCG AGC CCT GGA CCC CAG GCC AGC TAA 1526
Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
350 355 360

TGAGGCTGAC	TGGATGTCCA	GAGCTGGCCA	GGCCACTGGG	CCCTGAGCCA	GAGACAAGGT	1586
CACCTGGGCT	GTGATGTGAA	GACACCTGCA	GCCTTTGGTC	TCCTGGATGG	GCCTTTGAGC	1646
CTGATGTTTA	CAGTGTCTGT	GTGTGTGTGC	ATATGTGTGT	GTGTGCATAT	GCATGTGTGT	1706
GTGTGTGTGT	GTCTTAGGTG	CGCAGTGGCA	TGTCCACGTG	TGTGTGATTG	CACGTGCCTG	1766
TGGGCCTGGG	ATAATGCCCC	TGGTACTCCA	TGCATTACC	TGCCCTGTGC	ATGTCTGGAC	1826
TCACGGAGCT	CACCCATGTG	CACAAGTGTG	CACAGTAAAC	GTGTTTGTGG	TCAACAGA	1884

【0 1 0 8】

配列番号：3

配列の長さ： 1 4 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

[illegible]

Asp Leu Ser Gly Leu Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro

125

130

135

Gln Arg Leu Glu Leu

140

【0109】

配列番号：4

配列の長さ：1729

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GGCAGCCAGC GGCCTCAGAC AGACCCACTG GCGTCTCTCT GCTGAGTGAC CGTAAGCTCG	60
GCGTCTGGCC CTCTGCCTGC CTCTCCCTGA GTGTGGCTGA CAGCCACGCA GCTGTGTCTG	120
TCTGTCTGCG GCCCGTGCAI CCCTGCTGCG GCCGCTGGT ACCTTCCTTG CCGTCTCTTT	180
CCTCTGTCTG CTGCTCTGTG GGACACCTGC CTGGAGGCCC AGCTGCCCGT CATCAGAGTG	240
ACAGGTCTTA TGACAGCCTG ATTGGTGACT CCGGCTGGGT GTGGATTCTC ACCCCAGGCC	300
TCTGCCCTGCT TTCTCAGACC CTCATCTGTC ACCCCACGC TGAACCCAGC TGCCACCCCC	360
AGAAGCCCAT CAGACTGCCC CCAGCACACG GAATGGATTT CTGAGAAAGA AGCCGAAACA	420
GAAGGCCCGT GGGAGTCAGC ATG CCG CGT GGC TGG GCC GCC CCC TTG CTC CTG	473

Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu

1

5

10

CTG CTG CTC CAG GGA GGC TGG GGC TGC CCC GAC CTC GTC TGC TAC ACC	521
Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr	

15

20

25

GAT TAC CTC CAG ACG GTC ATC TGC ATC CTG GAA ATG TGG AAC CTC CAC	569
Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His	

30

35

40

CCC AGC ACG CTC ACC CTT ACC TGG CAA GAC CAG TAT GAA GAG CTG AAG	617
Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys	

45

50

55

GAC GAG GCC ACC TCC TGC AGC CTC CAC AGG TCG GCC CAC AAT GCC ACG	665
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr	

60	65	70	75	
CAT GCC ACC TAC ACC TGC CAC ATG GAT GTA TTC CAC TTC ATG GCC GAC				713
His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp				
80	85	90		
GAC ATT TTC AGT GTC AAC ATC ACA GAC CAG TCT GGC AAC TAC TCC CAG				761
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln				
95	100	105		
GAG TGT GGC AGC TTT CTC CTG GCT GAG AGC AAG TCC GAG GAG AAA GCT				809
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Lys Ser Glu Glu Lys Ala				
110	115	120		
GAT CTC AGT GGA CTC AAG AAG TGT CTC CCT CCT CCC CCT GGA GTT CCG				857
Asp Leu Ser Gly Leu Lys Lys Cys Leu Pro Pro Pro Pro Gly Val Pro				
125	130	135		
CAA AGA CTC GAG CTA TGAGCTGCAG GTGCGGGCAG GGCCCATGCC TGGCTCCTCC				912
Gln Arg Leu Glu Leu				
140				
TACCAGGGGA CCTGGAGTGA ATGGAGTGAC CCGGTCATCT TTCAGACCCA GTCAGAGGAG				972
TTAAAGGAAG GCTGGAACCC TCACCTGCTG CTTCTCCTCC TGCTTGTCAT AGTCTTCATT				1032
CCTGCCTTCT GGAGCCTGAA GACCCATCCA TTGTGGAGGC TATGGAAGAA GATATGGGCC				1092
GTCCCCAGCC CTGAGCGGTT CTTTCATGCCC CTGTACAAGG GCTGCAGCGG AGACTTCAAG				1152
AAATGGGTGG GTGCACCCCTT CACTGGCTCC AGCCTGGAGC TGGGACCCTG GAGCCCAGAG				1212
GTGCCCTCCA CCTTGGAGGT GTACAGCTGC CACCCACCCA GCAGCCCTGT GGAGTGTGAC				1272
TTCACCAGCC CCGGGGACGA AGGACCCCC CGGAGCTACC TCCGCCAGTG GGTGGTCATT				1332
CCTCCGCCAC TITCGAGCCC TGGACCCCAG GCCAGCTAAT GAGGCTGACT GGATGTCCAG				1392
AGCTGGCCAG GCCACTGGGC CCTGAGCCAG AGACAAGGTC ACCTGGGCTG TGATGTGAAG				1452
ACACCTGCAG CCTTTGGTCT CCTGGATGGG CCTTTGAGCC TGATGTTTAC AGTGTCTGTG				1512
TGTGTGTGCA TATGTGTGTG TGTGCATATG CATGTGTGTG TGTGTGTGTG TCTTAGGTGC				1572
GCAGTGGCAT GTCCACGTGT GTGTGATTGC ACGTGCCTGT GGGCCTGGGA TAATGCCCAT				1632
GGTACTCCAT GCATTCACCT GCCCTGTGCA TGCTGGACT CACGGAGCTC ACCCATGTGC				1692
ACAAGTGTGC ACAGTAAACG TGTTTGTGGT CAACAGA				1729

【 0 1 1 0 】

配列番号 : 5

配列の長さ : 2 3 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

配列

Met	Pro	Arg	Met	Pro	Pro	Thr	Pro	Ala	Thr	Trp	Met	Tyr	Ser	Thr	Ser
1				5					10					15	
Trp	Pro	Thr	Thr	Phe	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Gln	Thr	Ser	Leu	Ala	Thr
			20					25					30		
Thr	Pro	Arg	Ser	Val	Ala	Ala	Phe	Ser	Trp	Leu	Arg	Ala	Ser	Pro	Arg
		35					40				45				
Arg	Lys	Leu	Ile	Ser	Val	Asp	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Leu	Leu	Pro	Leu
	50					55				60					
Glu	Phe	Arg	Lys	Asp	Ser	Ser	Tyr	Glu	Leu	Gln	Val	Arg	Ala	Gly	Pro
65				70				75					80		
Met	Pro	Gly	Ser	Ser	Tyr	Gln	Gly	Thr	Trp	Ser	Glu	Trp	Ser	Asp	Pro
			85					90					95		
Val	Ile	Phe	Gln	Thr	Gln	Ser	Glu	Glu	Leu	Lys	Glu	Gly	Trp	Asn	Pro
		100					105					110			
His	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ile	Val	Phe	Ile	Pro	Ala	Phe	
	115					120				125					
Trp	Ser	Leu	Lys	Thr	His	Pro	Leu	Trp	Arg	Leu	Trp	Lys	Lys	Ile	Trp
	130					135				140					
Ala	Val	Pro	Ser	Pro	Glu	Arg	Phe	Phe	Met	Pro	Leu	Tyr	Lys	Gly	Cys
145				150					155					160	
Ser	Gly	Asp	Phe	Lys	Lys	Trp	Val	Gly	Ala	Pro	Phe	Thr	Gly	Ser	Ser
		165						170				175			
Leu	Glu	Leu	Gly	Pro	Trp	Ser	Pro	Glu	Val	Pro	Ser	Thr	Leu	Glu	Val
		180						185				190			
Tyr	Ser	Cys	His	Pro	Pro	Ser	Ser	Pro	Val	Glu	Cys	Asp	Phe	Thr	Ser
	195					200				205					
Pro	Gly	Asp	Glu	Gly	Pro	Pro	Arg	Ser	Tyr	Leu	Arg	Gln	Trp	Val	Val
	210					215				220					
Ile	Pro	Pro	Pro	Leu	Ser	Ser	Pro	Gly	Pro	Gln	Ala	Ser			
225				230						235					

【0 1 1 1】

配列番号：6

配列の長さ：1 7 2 9

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

GGCAGCCAGC GGCCTCAGAC AGACCCACTG GCGTCTCTCT GCTGAGTGAC CGTAAGCTCG	60
GCGTCTGGCC CTCTGCCTGC CTCTCCCTGA GTGTGGCTGA CAGCCACGCA GCTGTGTCTG	120
TCTGTCTGCG GCCCGTGCAT CCCTGCTGCG GCCGCCTGGT ACCTTCCTTG CCGTCTCTTT	180
CCTCTGTCTG CTGCTCTGTG GGACACCTGC CTGGAGGCCC AGCTGCCCCG CATCAGAGTG	240
ACAGGTCTTA TGACAGCCTG ATTGGTGA CTGGGTGGGT GTGGATTCTC ACCCCAGGCC	300
TCTGCCTGCT TTCTCAGACC CTCATCTGTC ACCCCCACGC TGAACCCAGC TGCCACCCCC	360
AGAAGCCCAT CAGACTGCCC CCAGCACACG GAATGGATT CTGAGAAAGA AGCCGAAACA	420
GAAGGCCCGT GGGAGTCAGC ATGCCGCGTG GCTGGGCGGC CCCCTTGCTC CTGCTGCTGC	480
TCCAGGGAGG CTGGGGCTGC CCCGACCTCG TCTGCTACAC CGATTACCTC CAGACGGTCA	540
TCTGCATCCT GGAAATGTGG AACCTCCACC CCAGCACGCT CACCCTTACC TGGCAAGACC	600
AGTATGAAGA GCTGAAGGAC GAGGCCACCT CCTGCAGCCT CCACAGGTCG GCCCACA	658
ATG CCA CGC ATG CCA CCT ACA CCT GCC ACA TGG ATG TAT TCC ACT TCA	705
Met Pro Arg Met Pro Pro Thr Pro Ala Thr Trp Met Tyr Ser Thr Ser	
1 5 10 15	
TGG CCG ACG ACA TTT TCA GTG TCA ACA TCA CAG ACC AGT CTG GCA ACT	753
Trp Pro Thr Thr Phe Ser Val Ser Thr Ser Gln Thr Ser Leu Ala Thr	
20 25 30	
ACT CCC AGG AGT GTG GCA GCT TTC TCC TGG CTG AGA GCA ACT CCG AGG	801
Thr Pro Arg Ser Val Ala Ala Phe Ser Trp Leu Arg Ala Ser Pro Arg	
35 40 45	
AGA AAG CTG ATC TCA GTG GAC TCA AGA AGT GTC TCC CTC CTC CCC CTG	849
Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro Leu	
50 55 60	
GAG TTC CGC AAA GAC TCG AGC TAT GAG CTG CAG GTG CGG GCA GGG CCC	897

Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly Pro	
65 70 75 80	
ATG CCT GGC TCC TCC TAC CAG GGG ACC TGG AGT GAA TGG AGT GAC CCG	945
Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp Pro	
85 90 95	
GTC ATC TTT CAG ACC CAG TCA GAG GAG TTA AAG GAA GGC TGG AAC CCT	993
Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn Pro	
100 105 110	
CAC CTG CTG CTT CTC CTC CTG CTT GTC ATA GTC TTC ATT CCT GCC TTC	1041
His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala Phe	
115 120 125	
TGG AGC CTG AAG ACC CAT CCA TTG TGG AGG CTA TGG AAG AAG ATA TGG	1089
Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile Trp	
130 135 140	
GCC GTC CCC AGC CCT GAG CGG TTC TTC ATG CCC CTG TAC AAG GGC TGC	1137
Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly Cys	
145 150 155 160	
AGC GGA GAC TTC AAG AAA TGG GTG GGT GCA CCC TTC ACT GGC TCC AGC	1185
Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser Ser	
165 170 175	
CTG GAG CTG GGA CCC TGG AGC CCA GAG GTG CCC TCC ACC CTG GAG GTG	1233
Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu Val	
180 185 190	
TAC AGC TGC CAC CCA CCC AGC AGC CCT GTG GAG TGT GAC TTC ACC AGC	1281
Tyr Ser Cys His Pro Pro Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe Thr Ser	
195 200 205	
CCC GGG GAC GAA GGA CCC CCC CGG AGC TAC CTC CGC CAG TGG GTG GTC	1329
Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val	
210 215 220	
ATT CCT CCG CCA CTT TCG AGC CCT GGA CCC CAG GCC AGC TAATGAGGCT	1378
Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser	
225 230 235	
GACTGGATGT CCAGAGCTGG CCAGGCCACT GGGCCCTGAG CCAGAGACAA GGTCACCTGG	1438
GCTGTGATGT GAAGACACCT GCAGCCTTTG GTCTCCTGGA TGGGCCTTTG AGCCTGATGT	1498
TTACAGTGTC TGTGTGTGTG TGCAATGTG TGTGTGTGCA TATGCATGTG TGTGTGTGTG	1558
TGTGTCTTAG GTGCGCAGTG GCATGTCCAC GTGTGTGTGA TTGCACGTGC CTGTGGGCCT	1618

1678
1729

配列番号： 7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列

5 7

Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly			
190	195	200	
Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp			
205	210	215	
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn			
220	225	230	235
Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala			
240	245	250	
Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile			
255	260	265	
Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly			
270	275	280	
Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser			
285	290	295	
Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu			
300	305	310	315
Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu			
320	325	330	
Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro			
335	340	345	
Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr			
350	355	360	
Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val			
365	370	375	
Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu			
380	385	390	395
Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser			
400	405	410	
Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser			
415	420	425	
Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly			
430	435	440	
Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp			
445	450	455	
Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu			
460	465	470	475

Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp
 480 485 490
 Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe
 495 500 505
 Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp
 510 515 520
 Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser
 525 530 535

【 0 1 1 3 】

配列番号 : 8

配列の長さ : 2 4 1 5

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

GGCAGCCAGC GGCCTCAGAC AGACCCACTG GCGTCTCTCT GCTGAGTGAC CGTAAGCTCG	60
GCGTCTGGCC CTCTGCCTGC CTCTCCCTGA GTGTGGCTGA CAGCCACGCA GCTGTGCTCG	120
TCTGTCTGCG GCCCCGTCAT CCCTGCTGCG GCCGCCTGGT ACCTTCCTTG CCGTCTCTTT	180
CCTCTGTCTG CTGCTCTGTG GGACACCTGC CTGGAGGCCC AGCTGCCCCG CATCAGAGTG	240
ACAGGTCTTA TGACAGCCTG ATTGGTGACT CGGGCTGGGT GTGGATTCTC ACCCCAGGCC	300
TCTGCCTGCT TTCTCAGACC CTCATCTGTC ACCCCCACGC TGAACCCAGC TGCCACCCCC	360
AGAAGCCCAT CAGACTGCCC CCAGCACACG GAATGGATTT CTGAGAAAGA AGCCGAAACA	420
GAAGGCCCCG GGGAGTCAGC ATG CCG CGT GGC TGG GCC GCC CCC TTG CTC CTG	473
Met Pro Arg Gly Trp Ala Ala Pro Leu Leu Leu	
1 5 10	
CTG CTG CTC CAG GGA GGC TGG GGC TGC CCC GAC CTC GTC TGC TAC ACC	521
Leu Leu Leu Gln Gly Gly Trp Gly Cys Pro Asp Leu Val Cys Tyr Thr	
15 20 25	
GAT TAC CTC CAG ACG GTC ATC TGC ATC CTG GAA ATG TGG AAC CTC CAC	569
Asp Tyr Leu Gln Thr Val Ile Cys Ile Leu Glu Met Trp Asn Leu His	

30	35	40	
CCC AGC ACG CTC ACC CTT ACC TGG CAA GAC CAG TAT GAA GAG CTG AAG			617
Pro Ser Thr Leu Thr Leu Thr Trp Gln Asp Gln Tyr Glu Glu Leu Lys			
45	50	55	
GAC GAG GCC ACC TCC TGC AGC CTC CAC AGG TCG GCC CAC AAT GCC ACG			665
Asp Glu Ala Thr Ser Cys Ser Leu His Arg Ser Ala His Asn Ala Thr			
60	65	70	75
CAT GCC ACC TAC ACC TGC CAC ATG GAT GTA TTC CAC TTC ATG GCC GAC			713
His Ala Thr Tyr Thr Cys His Met Asp Val Phe His Phe Met Ala Asp			
80	85	90	
GAC ATT TTC AGT GTC AAC ATC ACA GAC CAG TCT GGC AAC TAC TCC CAG			761
Asp Ile Phe Ser Val Asn Ile Thr Asp Gln Ser Gly Asn Tyr Ser Gln			
95	100	105	
GAG TGT GGC AGC TTT CTC CTG GCT GAG AGC ATC AAG CCG GCT CCC CCT			809
Glu Cys Gly Ser Phe Leu Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro Ala Pro Pro			
110	115	120	
TTC AAC GTG ACT GTG ACC TTC TCA GGA CAG TAT AAT ATC TCC TGG CGC			857
Phe Asn Val Thr Val Thr Phe Ser Gly Gln Tyr Asn Ile Ser Trp Arg			
125	130	135	
TCA GAT TAC GAA GAC CCT GCC TTC TAC ATG CTG AAG GGC AAG CTT CAG			905
Ser Asp Tyr Glu Asp Pro Ala Phe Tyr Met Leu Lys Gly Lys Leu Gln			
140	145	150	155
TAT GAG CTG CAG TAC AGG AAC CGG GGA GAC CCC TGG GCT GTG AGT CCG			953
Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Arg Gly Asp Pro Trp Ala Val Ser Pro			
160	165	170	
AGG AGA AAG CTG ATC TCA GTG GAC TCA AGA AGT GTC TCC CTC CTC CCC			1001
Arg Arg Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Ser Val Ser Leu Leu Pro			
175	180	185	
CTG GAG TTC CGC AAA GAC TCG AGC TAT GAG CTG CAG GTG CGG GCA GGG			1049
Leu Glu Phe Arg Lys Asp Ser Ser Tyr Glu Leu Gln Val Arg Ala Gly			
190	195	200	
CCC ATG CCT GGC TCC TCC TAC CAG GGG ACC TGG AGT GAA TGG AGT GAC			1097
Pro Met Pro Gly Ser Ser Tyr Gln Gly Thr Trp Ser Glu Trp Ser Asp			
205	210	215	
CCG GTC ATC TTT CAG ACC CAG TCA GAG GAG TTA AAG GAA GGC TGG AAC			1145
Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ser Glu Glu Leu Lys Glu Gly Trp Asn			

220	225	230	235	
CCT CAC CTG CTG CTT CTC CTC CTG CTT GTC ATA GTC TTC ATT CCT GCC				1193
Pro His Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Val Ile Val Phe Ile Pro Ala				
240	245	250		
TTC TGG AGC CTG AAG ACC CAT CCA TTG TGG AGG CTA TGG AAG AAG ATA				1241
Phe Trp Ser Leu Lys Thr His Pro Leu Trp Arg Leu Trp Lys Lys Ile				
255	260	265		
TGG GCC GTC CCC AGC CCT GAG CGG TTC TTC ATG CCC CTG TAC AAG GGC				1289
Trp Ala Val Pro Ser Pro Glu Arg Phe Phe Met Pro Leu Tyr Lys Gly				
270	275	280		
TGC AGC GGA GAC TTC AAG AAA TGG GTG GGT GCA CCC TTC ACT GGC TCC				1337
Cys Ser Gly Asp Phe Lys Lys Trp Val Gly Ala Pro Phe Thr Gly Ser				
285	290	295		
AGC CTG GAG CTG GGA CCC TGG AGC CCA GAG GTG CCC TCC ACC CTG GAG				1385
Ser Leu Glu Leu Gly Pro Trp Ser Pro Glu Val Pro Ser Thr Leu Glu				
300	305	310	315	
GTG TAC AGC TGC CAC CCA CCA CGG AGC CCG GCC AAG AGG CTG CAG CTC				1433
Val Tyr Ser Cys His Pro Pro Arg Ser Pro Ala Lys Arg Leu Gln Leu				
320	325	330		
ACG GAG CTA CAA GAA CCA GCA GAG CTG GTG GAG TCT GAC GGT GTG CCC				1481
Thr Glu Leu Gln Glu Pro Ala Glu Leu Val Glu Ser Asp Gly Val Pro				
335	340	345		
AAG CCC AGC TTC TGG CCG ACA GCC CAG AAC TCG GGG GGC TCA GCT TAC				1529
Lys Pro Ser Phe Trp Pro Thr Ala Gln Asn Ser Gly Gly Ser Ala Tyr				
350	355	360		
AGT GAG GAG AGG GAT CGG CCA TAC GGC CTG GTG TCC ATT GAC ACA GTG				1577
Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr Val				
365	370	375		
ACT GTG CTA GAT GCA GAG GGG CCA TGC ACC TGG CCC TGC AGC TGT GAG				1625
Thr Val Leu Asp Ala Glu Gly Pro Cys Thr Trp Pro Cys Ser Cys Glu				
380	385	390	395	
GAT GAC GGC TAC CCA GCC CTG GAC CTG GAT GCT GGC CTG GAG CCC AGC				1673
Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Leu Asp Leu Asp Ala Gly Leu Glu Pro Ser				
400	405	410		
CCA GGC CTA GAG GAC CCA CTC TTG GAT GCA GGG ACC ACA GTC CTG TCC				1721
Pro Gly Leu Glu Asp Pro Leu Leu Asp Ala Gly Thr Thr Val Leu Ser				

415	420	425	
TGT GGC TGT GTC TCA GCT GGC AGC CCT GGG CTA GGA GGG CCC CTG GGA			1769
Cys Gly Cys Val Ser Ala Gly Ser Pro Gly Leu Gly Gly Pro Leu Gly			
430	435	440	
AGC CTC CTG GAC AGA CTA AAG CCA CCC CTT GCA GAT GGG GAG GAC TGG			1817
Ser Leu Leu Asp Arg Leu Lys Pro Pro Leu Ala Asp Gly Glu Asp Trp			
445	450	455	
GCT GGG GGA CTG CCC TGG GGT GGC CGG TCA CCT GGA GGG GTC TCA GAG			1865
Ala Gly Gly Leu Pro Trp Gly Gly Arg Ser Pro Gly Gly Val Ser Glu			
460	465	470	475
AGT GAG GCG GGC TCA CCC CTG GCC GGC CTG GAT ATG GAC ACG TTT GAC			1913
Ser Glu Ala Gly Ser Pro Leu Ala Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp			
480	485	490	
AGT GGC TTT GTG GGC TCT GAC TGC AGC AGC CCT GTG GAG TGT GAC TTC			1961
Ser Gly Phe Val Gly Ser Asp Cys Ser Ser Pro Val Glu Cys Asp Phe			
495	500	505	
ACC AGC CCC GGG GAC GAA GGA CCC CCC CGG AGC TAC CTC CGC CAG TGG			2009
Thr Ser Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp			
510	515	520	
GTG GTC ATT CCT CCG CCA CTT TCG AGC CCT GGA CCC CAG GCC AGC TAA			2057
Val Val Ile Pro Pro Pro Leu Ser Ser Pro Gly Pro Gln Ala Ser			
525	530	535	
TGAGGCTGAC TGGATGTCCA GAGCTGGCCA GGCCACTGGG CCCTGAGCCA GAGACAAGGT			2117
CACCTGGGCT GTGATGTGAA GACACCTGCA GCCTTTGGTC TCCTGGATGG GCCTTTGAGC			2177
CTGATGTTTA CAGTGTCTGT GTGTGTGTGC ATATGTGTGT GTGTGCATAT GCATGTGTGT			2237
GTGTGTGTGT GTCTTAGGTG CGCAGTGGCA TGTCCACGTG TGTGTGATTG CACGTGCCTG			2297
TGGGCCTGGG ATAATGCCCA TGGTACTCCA TGCATTACCC TGCCCTGTGC ATGTCTGGAC			2357
TCACGGAGCT CACCCATGTG CACAAGTGTG CACAGTAAAC GTGTTTGTGG TCAACAGA			2415

【 0 1 1 4 】

配列番号 : 9

配列の長さ : 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CCGGCTCCCC CTTTCAACGT GACTGTGACC

30

【0115】

配列番号：10

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCAAGCTTC AGTATGAGCT GCAGTACAGG

30

【0116】

配列番号：11

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACCCTCTGAC TGGGTCTGAA AGATGACCGG

30

【0117】

配列番号：12

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATGGGCCCT GCCCGCACCT GCAGCTCATA

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はAC002303配列中に唯一存在するプローブ配列40952-40966を含む40952-40966の180塩基をqueryとしたBlast X検索による結果を示す模式図である。

【図2】

図2はAC002303配列中に唯一存在するプローブ配列40952-40966を含む40952-40966の180塩基を中心に5'、3'両方向に180塩基ずつBlast Xスキャンした結果を示す模式図である。

【図3】

図3はヒト胎児肝、骨格筋cDNAを鋳型としてSN1/AS1、SN1/AS2、SN2/AS1、SN2/AS2のプライマーの組み合わせでRT-PCR法にて増幅した結果を電気泳動した時の図を示す。

【図4】

図4はヒト胎児肝cDNAを鋳型として5'-RACE法、3'-RACE法を実施した結果を電気泳動した時の図を示す。

【図5】

図5はNR8 α のcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。RT-PCRに用いたプライマーの位置を矢印で示した。

【図6】

図6はNR8 β のcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。二つの可能なオープンリーディングフレーム(ORF)を示した。

【図7】

図7はNR8 γ のcDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を示す図である。オルタナティブスプライシングにより挿入される177アミノ酸を下線で示した。

【図8】

図8はNR8の各臓器における発現をNorthern Blottingにより解析した結果を示す図である。

【図9】

図9はNR8遺伝子の構造を模式的に示す図である。

【表1】その1

Table 1. Result of 2 steps Blast search

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TGGACTAATTGGAGC	Asn	AL009181	30692 tggagtaattggagc 30678	1p34.1-1p35	mIL11R(opposite), FOBR
TGGAGCTGATGGAGC	***	Z97987	140006 tggagctgatggagc 139992	1p36.2-36.3	line1, Leu Zip p40,
TGGAGCAGCTGGAGC	Ser	AF023268	39931 tggagcagctggagc 39917	1q21	metaxin
TGGAGCTGCTGGAGC	Cys	AL009051	78023 tggagctgctggagc 78037	1q23-24	HP-10, semaphorin F,G
TGGAGCACGTGGAGT	Thr	Z97200	112905 tggagcacgtggagt 112891	1q24	AFP enhancer BP, RAR
TGGAGTGCCTGGAGC	Ala	U95626	101031 tggagtgcctggagc 101017	3	CFTC, TcR
TGGAGTAGATGGAGT	Arg	Z84495	2547 tggagtagatggagt 2533	3p21.3	trithorax
TGGAGCTGATGGAGT	***	Z74023	5255 tggagctgatggagt 5241	3p21.3	E2ABP, fibronectin, nidgen
TGGAGTTTCTGGAGT	Phe	Z68275	7291 tggagtttctggagt 7277	4p16.3	mena, NMDAR
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	Z54072	21277 tggagtgcctggagt 21291	4p16.3	crk, AchR, HER3
TGGAGCTGCTGGAGC	Cys	Z69837	30266 tggagctgctggagc 30252	4p16.3	KIT, FLT3, PDGFRa
TGGAGTTACTGGAGT	Tyr	AC003951	27290 tggagtactggagt 27304	5	collagen
TGGAGCCTGTGGAGT	Leu	AC004502	48334 tggagcctgtggagt 48320	5	ADAMTS-1, properdin, etc
TGGAGTTGATGGAGC	***	L81613	2418 tggagttgatggagc 2404	5	APC, bat2, p53
TGGAGTGTATGGAGT	Val	AC002122	43679 tggagtgtatggagt 43665	5p15.2	Met tRNA syntase
TGGAGTCCATGGAGT	Pro	AC002380	34646 tggagtccatggagt 34632	5p15.2	N-WASP, enigma
TGGAGCAACTGGAGC	Asn	AC002479	80443 tggagcaactggagc 80457	5p15.2	NEU, glycoprotein C
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	AC004592	125445 tggagctgctggagt 125431	5q31	CD22-B
TGGAGTAGCTGGAGT	Ser	AC002393	3721 tggagttagctggagt 3735	6	glycoprotein
TGGAGTTGCTGGAGT	Cys	AC002326	114578 tggagttgctggagt 114564	6	G3P REGULON
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	Z84490	20244 tggagtgcattggagt 20230	6	Alu, adrenergic receptor

【表1】その2

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TTGGAGTTTCTGGAGC	Phe	AC002112	68699 tggagtttctggagc 68685	6	IgHv, MYD116
TGGAGCGGCTGGAGC	Gly	U89336	35829 tggagcggctggagc 35815	6p21	myosin HC, cep250,
TGGAGCGTCTGGAGC	Val	U53588	3558 tggagcgtctggagc 3572	6p21.3	ring finger, BRCA1
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	Z98744	38358 tggagtgcattggagt 38344	6p21.3-22.3	Alu, AD7c-NTP
TGGAGTTGCTGGAGT	Cys	AL009031	104325 tggagttgctggagt 104311	6p22.3-24.1	ACC synthase
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AL008729	21325 tggagtgtctggagt 21339	6p24	E1A, DUB-2
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	Z98755	69825 tggagttgttggagt 69811	6q16.1-21	dynein
TGGAGCTTCTGGAGC	Phe	Z98172	35554 tggagcttctggagc 35540	6q21	HGXPRT
TGGAGCAGGTGGAGC	Arg	Z97989	79116 tggagcaggtggagc 79102	6q21-22	syn fyn, slk, yes, src
TGGAGCTAATGGAGT	***	Z95326	16562 tggagctaattggagt 16576	6q22.1-6q22.33	tyrosinase
TGGAGCTCTTGGAGC	Ser	Z98049	25800 tggagctcttggagc 25786	6q26-q27	collagen, AT3, C1Qb
TGGAGCTCCTGGAGT	Ser	AC003090	22068 tggagctcctggagt 22082	7p15	ICE
TGGAGTATATGGAGC	Ile	AC004744	22740 tggagtatatggagc 22754	7p15-p21	TSH-R, RNABP
TGGAGTAGCTGGAGC	Ser	AC004485	86356 tggagtagctggagc 86370	7p15-p21	Hox 2.4, mLL11Ra(stop*)
TGGAGTCTTTGGAGT	Leu	AC004141	3130 tggagtctttggagt 3144	7p21-p22	polyprotein
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC004548	62876 tggagcagatggagc 62862	7q11.23-q21.1	NCAM
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	AC002456	69500 tggagcaactggagt 69514	7q21	glycoprotein A
TGGAGTAACTGGAGT	Asn	AC000064	9170 tggagtaactggagt 9184	7q21-22	GA3PD
TGGAGTTATTGGAGT	Tyr	AC003085	87341 tggagttattggagt 87355	7q21-22	Nmyc, FGFR
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC000119	65235 tggagttgttggagt 65221	7q21-7q22	FVIII, TopoIII
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC002458	44435 tggagttgttggagt 44421	7q21-q22	telomerase, NFAT
TGGAGTACATGGAGC	Thr	AC000059	9977 tggagtacatggagc 9963	7q21-7q22	Alu, Notch4

【表1】その3

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TGGAGTCAGTGGAGG	Gln	AC000519	103655 tggagtcagtgaggat 103669	7q21-7q22	reverse transcriptase
TTGGAGTATTTGGAGT	Ile	AC002384	52216 tggagtatttggagt 52202	7q22	pol, GHR(another frame)
TGGAGCAGCTGGAGT	Ser	AC004522	55291 tggagcagctggagt 55277	7q22-q31.1	hemoglobin beta
TGGAGTGTGGAGT	Val	AC002466	43273 tggagtgttggagt 43287	7q31	ryanodine receptor, mTPO
TGGAGTGGCTGGAGC	Gly	AC002543	112948 tggagtggctggagc 112962	7q31.2	EGF, P-selectin
TGGAGCTGATGGAGC	***	AC000061	79564 tggagctgatggagc 79550	7q31.2	laminin B1, tubulin
TGGAGTTTTGGAGT	Phe	AC000125	13750 tggagtttttggagt 13736	7q31.3	p150
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC002498	20166 tggagttgttggagt 20152	7q31.3	IL3Rb(opposite)
TGGAGCGGCTGGAGC	Gly	U66059	158491 tggagcgggtggagc 158477	7q35(TcRb)	properdin
TGGAGCATTGGAGC	Ile	AC003109	4761 tggagcatttggagc 4775	7q36	CD2, HOX-2.6
TGGAGTTATTGGAGT	Tyr	AF027390	174448 tggagttattggagt 174434	7q tel	IkB, V2R
TGGAGCATATGGAGT	Ile	AC002052	28882 tggagcatatggagt 28896	9p22	myosin VIIA, OSMRb
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	AC001643	27345 tggagcaactggagt 27331	9q34	hox1.4, gastrinR
TGGAGCGGATGGAGC	Gly	AC000396	16394 tggagcggatggagc 16380	9q34	vWf, laminin a3
TGGAGTGAGTGGAGT	Glu	U73649	16850 tggagtgttggagt 16836	11	zinc finger
TGGAGTGGCTGGAGT	Gly	U73649	16859 tggagtggctggagt 16845	11	zinc finger
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	U73629	31027 tggagtgcctggagt 31041	11	Alu, gp2b, BCGF-12
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	U73629	36731 tggagtccctggagc 36745	11	PPAR-gamma, hemagglutinin
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	U73643	14550 tggagtccctggagc 14564	11	reverse transcriptase
TGGAGCAACTGGAGC	Asn	AF015416	65621 tggagcaactggagc 65635	11p15.5	Nasopressin R, OSMR
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AC002350	23543 tggagtgcattggagt 23529	12q24	Alu, IFNaR

【表1】 その4

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AC004217	88822 tggagtgcattggagt 88808	12q24.1	Alu, HPK
TTGGAGTTACTGGAGC	Tyr	AC002978	65893 tggagttactggagc 65907	12q24	clathrin LC, EPOR(nonWS)
TGGAGTTCTGGAGT	Cys	AC000403	91715 tggagttctggagt 91729	13	VHL, inhibin B
TGGAGCGGTTGGAGC	Gly	X97051	73621 tggagcggttggagc 73607	14q32.33 (IgD)	polycystic kidney
TGGAGTAGGTGGAGC	Arg	AC003024	15596 tggagtaggtggagc 15582	15q26	pksF
TGGAGTTTCTGGAGC	Phe	AC002492	93356 tggagtttctggagc 93370	16	pol, PRLR
TGGAGTTCATGGAGT	Ser	U91318	102406 tggagttcatggagt 102392	16	ICAM1, MIBP1
TGGAGTGTATGGAGT	Val	AC002289	10631 tggagtgtatggagt 10645	16	Alu
TGGAGGCACTGGAGT	His	U91318	152252 tggagtcactggagt 152238	16	lammm, alpha5
TGGAGTTAATGGAGT	***	AC002519	81768 tggagttaatggagt 81754	16	Rho, Notch
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	U91326	84127 tggagctgctggagt 84113	16p11.2	NIPI-like, IL2R(nonWS)
TGGAGTGAATGGAGT	Glu	AC002303	40952 tggagtgaaatggagt 40966	16p12	TPOR, OBR, and many
TGGAGCACTTGGAGC	Thr	AC002551	82245 tggagcacttggagc 82259	16p12.1	envelope, androgen R
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	AC002299	162 tggagtccctggagc 148	16p12-p13.1	CYCLIN H, FN
TGGAGCTATGGAGC	Tyr	AC002299	84540 tggagctatggagc 84526	16p12-p13.1	Alu, RNA-editase
TGGAGTCACTGGAGT	His	U95737	16130 tggagtcactggagt 16144 16374 tggagtcactggagt 16388 16599 tggagtcactggagt 16613	16p13.1	TcRa, HLAa Notch, Pro-rich phosphatase, ORFB
TGGAGTCTCTGGAGC	Pro	U91318	112272 tggagtctctggagc 112286	16p13.1	CD30, collagen, MAP1a
TGGAGCACTTGGAGC	Thr	AC004509	26031 tggagcacttggagc 26045	16p13.3	TcRb
TGGAGCCGTTGGAGC	Arg	AC004496	28217 tggagccgttggagc 28231	16p13.3	mucin, ET1, IL12R(nonWS)

【表1】その5

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TGGAGCCGCTGGAGC	Arg	AC004232	34550 tggagccgctggagc 34564	16p13.3	IgLk, AGPR
TTGGAGTACTTGGAGC	Thr	AJ003147	151180 tggagtacttggagc 151166	16p13.3	RanBP2
TGGAGCGTGTGGAGC	Val	X71874	11520 tggagcgtgtggagc 11534	16q22.1	collagen a5IV
TGGAGCAAATGGAGT	Lys	AC003663	114346 tggagcaaatggagt 114360	17	beta-D-glucosidase
TGGAGTCTCTGGAGC	Leu	AC003957	52898 tggagtctctggagc 52884	17	TIE-1, SEX, Rho,
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC003971	76277 tggagcagatggagc 76263	18	LIAMK-1, TeR
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AD000812	30891 tggagtgcattggagt 30905	19	Alu
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	AC002126	85832 tggagtgcattggagt 85846	19	Alu-AD7C-NTF
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	AC004660	10008 tggagctgctggagt 10022	19	Reps1
TGGAGCCCCTGGAGT	Pro	AC004490	14389 tggagcccctggagt 14403	19	mucin, ataxin-2, N-WASP
TGGAGTCAGTGGAGC	Glu	AC003112	18315 tggagtgcattggagc 18301	19p12(NR6)	TPOR, PRLR, OBR, etc
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC004004	39010 tggagcagatggagc 38996	19p12	PRLR, IL12R, GM-
			-----presumably a pseudogene-----		CSFRb, IL11R(+stop codon)
			39177 tggagcagatggagc 39163		IL3Ra(weak, 22, nonWS)
TGGAGCACCTGGAGT	Thr	AD000685	21015 tggagcaactggagt 21001	19p13.1	GM-CSFRb(nonWS+stop)
TGGAGCTGATGGAGC	***	AC002115	37164 tggagctgatggagc 37178	19q13.1	Mpc2, Pro rich protein
TGGAGCCAGTGGAGC	Gln	M63796	7622 tggagccagtggagc 7636	19q13.3	NFCP, titin, Jagged 2
TGGAGTTACTGGAGT	Tyr	AC004505	31711 tggagttactggagt 31725	20	Gap junction
TGGAGTTGATGGAGC	***	Z93016	31093 tggagttgatggagc 31079	20q12-13.2	smaphorin F, GHS-R, JAK2
TGGAGTCAATGGAGT	Gln	L35677	579 tggagtcaatggagt 565	21(MX1)	GLI, IL9R, IL7R(nonWS)
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	AF039907	29892 tggagtgcctggagt 29906	21	IgV, Cyt.Oxidase
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AG000937	105 tggagtgtctggagt 91	21q	peroxidase

【表1】その6

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TGGAGTAAATGGAGT	Lys	AP000034	28803 tggagtaaattggagt 28789	21q11.1	Na/Ca exchanger
TGGAGTAGGTGGAGT	Arg	AP000039	24900 tggagtaggtggagt 24914	21q11.1	RNA polymerase
TGGAGTGAGTGGAGT	Glu	AP000035	21721 tggagtgtgtggagt 21707	21q11.1	smaphorin F
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AG000038	26164 tggagtgtctggagt 26150	21q11.1	Glycoprotein
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	AP000038	26164 tggagtgtctggagt 26150	21q11.1	PKC
TGGAGTGCCTGGAGT	Ala	AP000045	7204 tggagtgcctggagt 7218	21q11.1	IgV,
TGGAGCATTTGGAGC	Ile	AP000052	93726 tggagcatttggagc 93740	21q11.1	Ig H, TCF-3, CETP
TGGAGCCTCTGGAGC	Leu	AP000037	17581 tggagcctctggagc 17567	21q11.1	Alu, BCGF
TGGAGTGGGTGGAGT	Gly	AP000015	48480 tggagtgggtggagt 48494	21q22.2	TPO
TGGAGTGAGTGGAGT	Glu	Z97055	151632 tggagtgtgtggagt 151618	22	semaphorin H, CD44
TGGAGCTGGTGGAGT	Trp	Z83856	8503 tggagtgggtggagt 8489	22	ERF
TGGAGTGGGTGGAGT	Gly	Z95113	69325 tggagtgggtggagt 69311	22q11.2-qter	factor H
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	Z93784	36348 tggagtgcattggagt 36362	22q11.2-qter	Alu, NF2
TGGAGCCTCTGGAGT	Leu	AC002308	130741 tggagcctctggagt 130727	22q11.2	collagen a1, Na channel
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	AC000086	40705 tggagtccctggagc 40691	22q11.2	ADH, collagen
TGGAGCATCTGGAGC	Ile	L77569	21088 tggagcatctggagc 21074	22q11.2	clathrin heavy chain 2
TGGAGCATCTGGAGC	Ile	AC000072	24248 tggagcatctggagc 24262	22q11.2	clathrin heavy chain 2
TGGAGCAGCTGGAGC	Ser	AC000092	9817 tggagcagctggagc 9803	22q11.2	IgHv, PC binding
TGGAGCAACTGGAGC	Asn	Z95116	64481 tggagcaactggagc 64495	22q12.1	p150, ILA(ROVSNWSE)
TGGAGCTAGTGGAGC	***	AC003071	114780 tggagctagtggagc 114794	22q12.1-qter	FGFRb
TGGAGCCCTGGAGC	Pro	Z80902	2675 tggagccctggagc 2661	22q12-qter	collagen a1
TGGAGCTCTGGAGT	Ser	Z79999	40825 tggagctctggagt 40839	22q12-qter	collagen a1,

【表1】その7

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TGGAGCCATTGGAGT	His	Z81308	12575 tggagccattggagt 12561	22q12-qter	MYF-5, p53, INK4a
TGGAGCGACTGGAGT	Glu	AL008637	85322 tggagcgactggagt 85336	22q12.3-13.2	GM-CSFRb, IL3R, EPOR, etc
TTGGAGTGAGTGGAGT	Glu	U62317	77740 tggagtggagtggagt 77726	22q13	latrophilin-related
TGGAGTGCATGGAGT	Ala	Z98045	31082 tggagtgcattggagt 31068	22q13	Alu, G-CSFR, AD7c-NTP
TGGAGTTGTTGGAGT	Cys	AC002422	19151 tggagtgttggagt 19137	X	cGMP PDase
TGGAGTGTCTGGAGT	Val	Z73418	31830 tggagtgtctggagt 31816	X	WNT-8D, Mi-2
TGGAGTCTTTGGAGT	Leu	Z83843	114972 tggagtctttggagt 114958	X	reverse transcriptase
TGGAGTCTCTGGAGT	Leu	Z99706	7749 tggagtctctggagt 7735	X*	Selenoprotein
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	AC002420	70704 tggagcaactggagt 70690	X	homeoprotein, OBR(stop)
TGGAGCATGTGGAGT	Met	Z77249	5702 tggagcatgtggagt 5688	X	TcRb, mIFR
TGGAGTTCCTGGAGC	Ser	Z83131	4904 tggagtctctggagc 4890	X	VPS41 homolog
TGGAGTGGCTGGAGC	Gly	AC004388	239975 tggagtggctggagc 239989	X	GAP, mLIFR(stop)
TGGAGTGGCTGGAGC	Gly	AC004378	73509 tggagtggctggagc 73495	X	RNAse m, mIFR(stop)
TGGAGTCTATGGAGC	Leu	Z70050	9934 tggagtctatggagc 9948	X	complement C8, C7
TGGAGTCTATGGAGC	Leu	Z73985	40766 tggagtctatggagc 40780	X	complement C8, C7
TGGAGCTGTTGGAGC	Cys	L44140	112657 tggagctgttggagc 112671	X	rab GDI alpha, BDGF
TGGAGCTCATGGAGC	Ser	AC004383	144906 tggagctcatggagc 144892	X	RTase, transposon
TGGAGTAAATGGAGC	Lys	Z69732	31681 tggagtaaatggagc 31695	Xp11	OT-R, acrosin
TGGAGTTCGTGGAGC	Ser	Z92545	88703 tggagtctgtggagc 88717	Xp11	PMK1
TGGAGCTTCTGGAGC	Phe	AL008709	46089 tggagcttctggagc 46075	Xp11.23-Xp11.4r	MHC class 1a, HLA-C
TGGAGTTTCTGGAGT	Phe	U96409	116332 tggagtttctggagt 116346	Xp22	myosin H
TGGAGTTGCTGGAGT	Cys	AC003106	89544 tggagttgctggagt 89530	Xp22	IL9R

【表1】その8

Probe	Xaa	accession	location of hit	locus	blastx (expect=100)
TTGGAGTCACTGGAGT	His	AL021706	11982 tggagtcactggagt 11968	Xq21.1-21.33	dopamine receptor
TGGAGCTGGTGGAGT	Trp	AC000113	119188 tggagctggtggagt 119202	Xq23	DNA repair protein, MHC
TGGAGCAAGTGGAGT	Lys	AF007262	98212 tggagcaagtggagt 98226	Xq28	RNA polymerase
TGGAGCTGCTGGAGT	Cys	U82671	35792 tggagctgctggagt 35806	Xq28	XTCF-3c
TGGAGTCAGTGGAGC	Gln	AF011889	144465 tggagtcagtggagc 144451	Xq28	GHRHR, Werner Synd.
TGGAGCTAATGGAGC	***	AF030876	107409 tggagctaattggagc 107395	Xq28	gp41, clk3
		AF0081078	94438 tggagctaattggagc 94424	Xq28	gp41
		Z47046	5638 tggagctaattggagc 5624	Xq28	gp41
TGGAGTTTCTGGAGT	Phe	AC002531	106698 tggagtttctggagt 106712	Y	Alu, hpk
TGGAGCAGTTGGAGC	Ser	AC004474	124745 tggagcagttggagc 124731	Y	EGFR, Smad6
TGGAGTTTGTGGAGT	Leu	U26425	12899 tggagtttgtggagt 12913	PLCb2	PRLR(opposite)
TGGAGCAACTGGAGT	Asn	U96726	61672 tggagcaactggagt 61658	mouse DNA	envelope mIL11R(opposite)
TGGAGTCCCTGGAGC	Pro	<u>U65324</u>	22244 tggagtccttggagc 22230	MHC class II	CFTC, <u>IL6Rb</u>
TGGAGCAGATGGAGC	Arg	AC002482	14276 tggagcagatggagc 14290	RG208003	I-309, TcR, IL9R(nonWS)
TGGAGCTCTTGGAGC	Ser	U34879	24914 tggagctcttggagc 24928	EDH17B2	Large tegument protein commonR(oppsit_nonWS)
TGGAGCCTTTGGAGC	Leu	Z15025	6359 tggagcctttggagc 6373	Bat2	bat2,mucin, <u>GM-CSFRb(opposite_stop)</u>

Redundant clones were shaded. Highlighted and underlined were Hits and Pseudo-hits respectively.

【表 2】

Table 2 NR8 CDS on Chromosome 16p12(AC002303)

Exon	# in AC002303	# in NR8	Features
1	<1	: 1-424	in frame stop codon
2	26334-26398	: 425-489	initiation codon, signal peptide
3	30625-30727	: 490-592	conserved Cys residues
4	33766-33965	: 593-792	conserved Cys residues, N-glycosylation sites
5	39240-39394	: 793-947	Pro-rich motif (PAPPF), N-glycosylation sites
6	40820-40997	: 948-1125	gtWSEWSdp motif
7	41455-41554	: 1126-1225	transmembrane domain
8	42285-42366	: 1226-1307	Box1 (IWAVPSP)
9a	44812-44909	: 1308-1405*	join to exon10, Box2? (PSTLEVYSCH), non-conserved boundary
9b	44812-45922<	: 1308-2465**	double stop codons, Box2? (PSTLEVYSCH, PAELVESDG), poly A
10	45441-45922<	: 1406-1934*	double stop codons, poly A

NR8 alpha* : Exons 1+2+3+4+5+6+7+8+9a+10

NR8 beta : Exons 1+2+3+4+6+7+8+9a+10(two alternative reading frames for soluble and TM (-signal) forms)

NR8 gamma** : Exons 1+2+3+4+5+6+7+8+9b (hypothetical)

【書類名】 図面

【図 1】

Alignment of NR8 sequence surrounding WSXWS motif (BlastX result)

NR8	40862	SLPPEERKDSSEYEOVRAGPMGSSYGDTNSENSDPVTEITOSEGRCEAGMDTPLL	41032
hTPOR	442	ELRPRSRVRLQLRAR-LNGPTVGGPSSSDPTRVEFATE	481
hOBR	292	SLIVDSILPGSSYEVDVRGKRLDTP-GINSDSTERVHTQ	331
hIL2Rb	201	DTOTYEFVVRVKPLOGFT-TWSPYSOPLAERTK	232
hIL7R	189	TEQKRLQPAAMYGIKVRSL-EDHYFKGFNSENSSPSYFRTPPEINNSSGEMDPILE	243
hGM-CSFRb	196	TLCPEHLMPSTIVARVTRLAAGSRLSRPSKNSPEVCWDSQ	238
	419	TYNGIWNSENSEARSWDTE	438
mIL3Rb	200	NIEPKLFLPNSIAARVTRLAAGSRLSRPSKNSPEVHWDSQ	242
	404	GLEPDTSCARVVKPI-SQYDGIWSENSENEYTWTE	438
hIL5Ra	302	SKYDQDVRAAVSSMCREAGLWSENSEPI	329
hIL9R	241	YTDWSENSESPVCFO	255
hEPOR	211	RGRTRVTFVRRAR-MAEPSFGGFNSANSEPVSLITPSD	247
hIL2Rr	209	SLPSVDGQKRYTFRVRSRFLNLCSSAQH-TSENSEPI	244
hIL12R	197	LCPEEMNVAQEFQRRRLGSGSS-WSKNSDPV	229
hIL12Rb	282	DLKPFTEYEFQISSKL-HLYKGSWDWSESLEAQTPEE	319

: Numbers for NR8 were in nucleotides. Non-shaded sequence represents intronic region.

【図 2】

Search of neighbor exons by BlastX

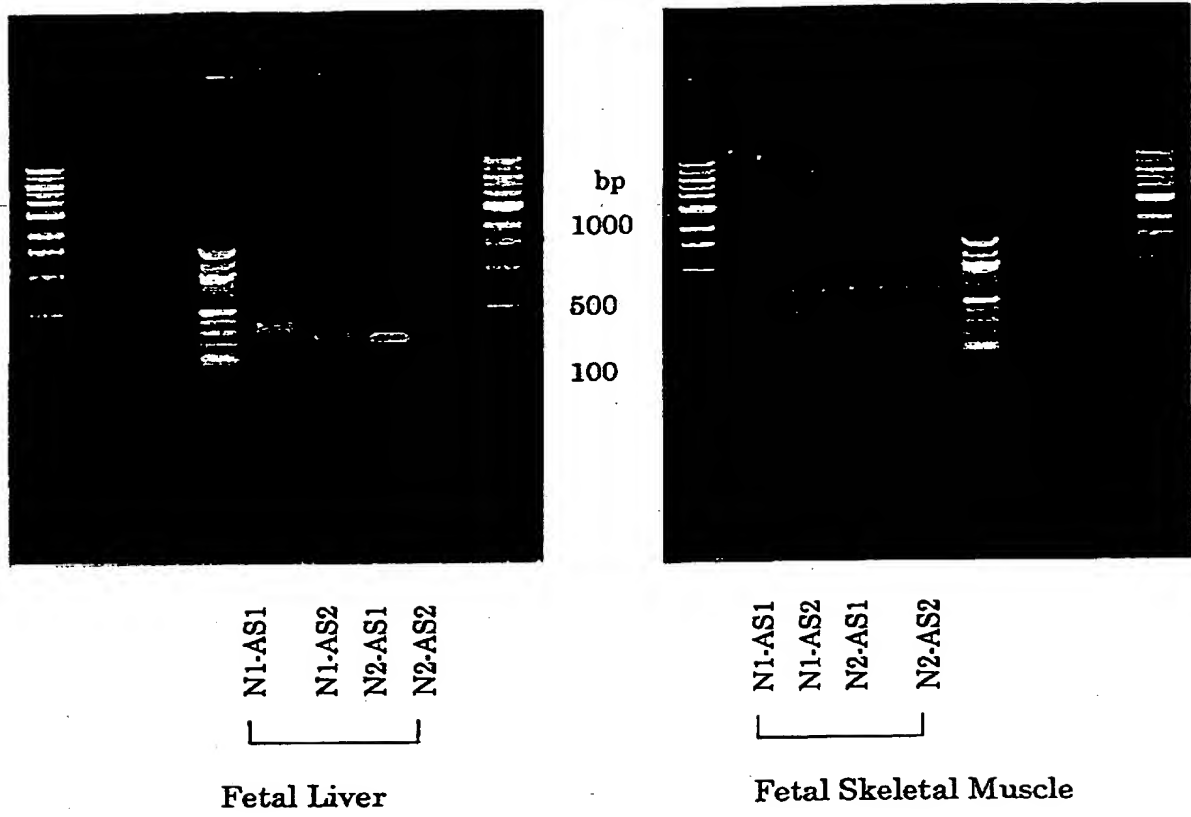
[Query : 39181-39360]

NR8	53	HOVKPAPPEN-VIAIFSGOYNLSHRS-DYEDP-AFYMLKGGLOV	175
hIL6Ra	214	LOPDPPANI-TVIAVAR-NPRMLSVTWQDEHSWNSSEYRERFELRY	257
hgp130	218	YKVKPNPPHNL-SVINSEELSSILKLTWT-NPSIKSV-IIEKYNIOV	261
rOBRb	234	VKPDPPGLRMEVTDGINKTSWDSOTKAP	263

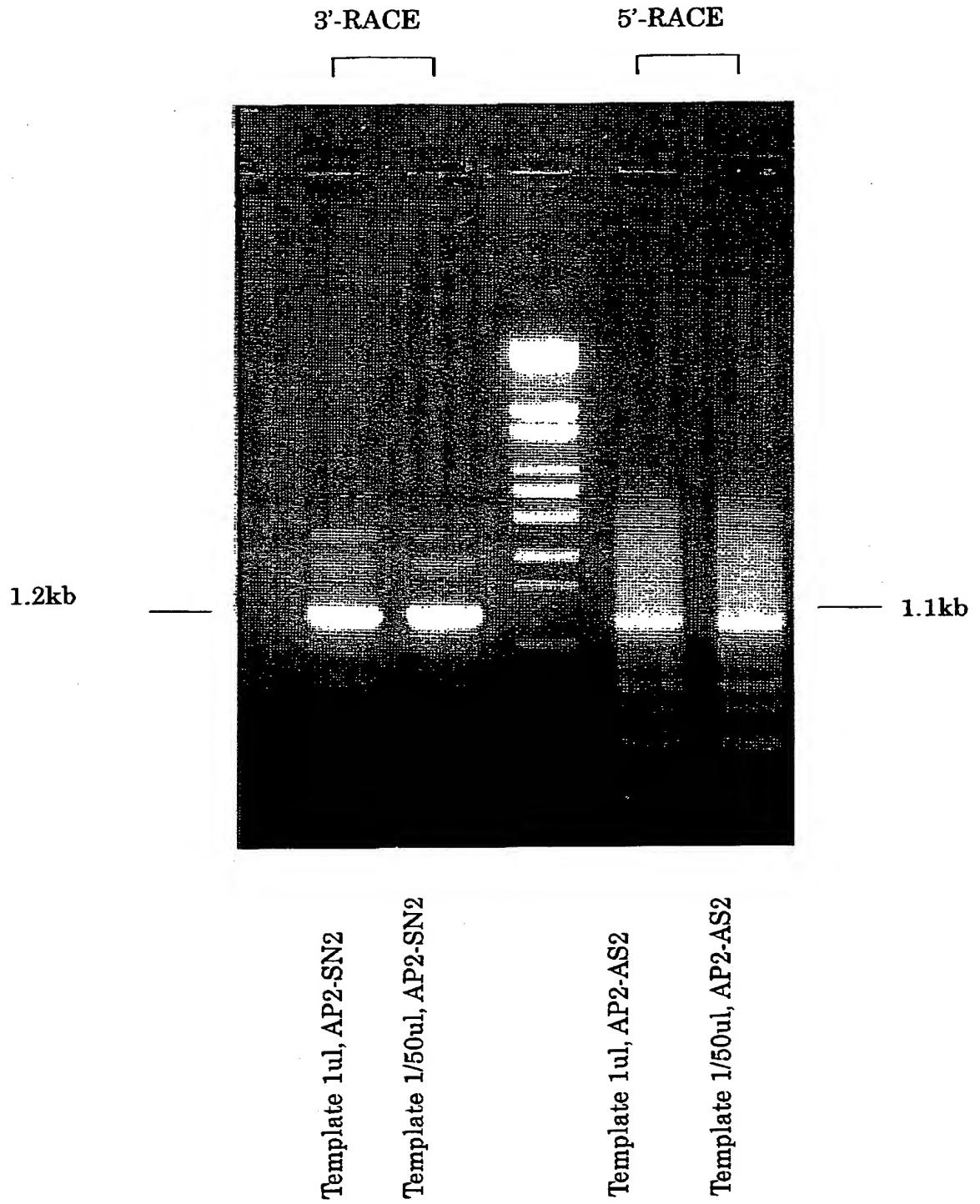
[Query : 42301-42480]

NR8	7	VPSPERFFMPYKGCSCDFK	66
mIL9R	305	IPSPERFFMPYSVYHEDFQ	324
hIL9R	305	VPSPAMFFOPYSVHNGNEQ	324

【図3】



【図4】



【図5】

その1

10	20	30	40	50	60	70	80
GGCAGCCAGCGGCCTCAGACAGACCCACTGGCGTCTCTCTGCTGAGTGACCGTAAGCTCGGCGTCTGGCCCTCTGCCTGC							
90	100	110	120	130	140	150	160
CTCTCCCTGAGTGTGGCTGACAGCCACGCAGCTGTGTCTGTCTGTCTGCGGCCCGTGCATCCCTGCTGCGGCCGCGCTGGT							
170	180	190	200	210	220	230	240
ACCTTCCTTGGCGTCTCTTTCCTCTGTCTGCTGCTGTGTGGACACCTGCCTGGAGGCCAGCTGCCGTCATCAGAGTG							
250	260	270	280	290	300	310	320
ACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGATTCTACCCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACC							
330	340	350	360	370	380	390	400
CTCATCTGTACCCCCACGCTGAACCCAGCTGCCACCCCCAGAAGCCCATCAGACTGCCCCAGCACACGGAATGGATT							
410	420	430	440	450	460	470	480
CTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGCCGCTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCTTGCTCCTGCTGCTGC							
M P R G W A A P L L L L L L							
490	500	510	520	530	540	550	560
TCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTACCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGG							
Q G G W G C P D L V C Y T D Y L Q T V I C I L E M W							
570	580	590	600	610	620	630	640
AACCTCCACCCAGCAGCTCACCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCCACCTCCTGCAGCCT							
N L H P S T L T L T W Q D Q Y E E L K D E A T S C S L							
650	660	670	680	690	700	710	720
CCACAGGTGCGCCCAATGCCACGCATGCCACCTACACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATT							
H R S A H N A T H A T Y T C H M D V F H F M A D D I F							
730	740	750	760	770	780	790	800
TCAGTGTCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCAGGAAGTGTGGCAGCTTTCTCCTGGCTGAGAGCATCAAGCCG							
S V N I T D Q S G N Y S Q E C G S F L L A E S I K P							
810	820	830	840	850	860	870	880
GCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGACCTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTGCCTT							
A P P F N V T V T F S G Q Y N I S W R S D Y E D P A F							
890	900	910	920	930	940	950	960
CTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAACCGGGAGACCCCTGGGCTGTGAGTCCGAGGAGAA							
Y M L K G K L Q Y E L Q Y R N R G D P W A V S P R R K							
970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
AGCTGATCTCAGTGGACTCAAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCCCTGGAGTTCGCAAAGACTCGAGCTATGAGCTGCAGGTG							
L I S V D S R S V S L L P L E F R K D S S Y E L Q V							
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
CGGGCAGGGGCCCATGCCTGGCTCCTCCTACCAGGGGACCTGGAGTGAATGGAGTGACCGGTCATCTTTCAGACCCAGTC							
R A G P M P G S S Y Q G T W S E W S D P V I F Q T Q S							
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AGAGGAGTTAAAGGAAGGCTGGAACCCTCACCTGCTGCTTCTCCTCCTGCTTGTGCATAGTCTTCATTCTGCCTTCTGGA							

【図5】

その2

```

E E L K E G W N P H L L L L L L V I V F I P A F W S
1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
GCCTGAAGACCCATCCATTGTGGAGGCTATGGAAGAAGATATGGGCCGTCCCAGCCCTGAGCGGTTCTTCATGCCCTG
L K T H P L W R L W K K I W A V P S P E R F F M P L
1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
TACAAGGGCTGCAGCGGAGACTTCAAGAAATGGGTGGGTGCACCCTTCACTGGCTCCAGCCTGGAGCTGGGACCCTGGAG
Y K G C S G D F K K W V G A P F T G S S L E L G P W S
1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
CCCAGAGGTGCCCTCCACCCTGGAGGTGTACAGCTGCCACCCAGCAGCCCTGTGGAGTGTGACTTCACCAGCCCCG
P E V P S T L E V Y S C H P P S S P V E C D F T S P G
1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
GGGACGAAGBACCCCCCGGAGCTACCTCCGCCAGTGGGTGGTCATTCTCCGCCACTTTGAGCCCTGGACCCAGGCC
D E G P P R S Y L R Q W V V I P P P L S S P G P Q A
1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
AGCTAATGAGGCTGACTGGATGTCCAGAGCTGGCCAGGCCACTGGGCCCTGAGCCAGAGACAAGGTACCTGGGCTGTGA
S * *
1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
TGTGAAGACACCTGCAGCCTTTGGTCTCCTGGATGGGCCTTTGAGCCTGATGTTTACAGTGTCTGTGTGTGTGCATAT
1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
GTGTGTGTGTGCATATGCATGTGTGTGTGTGTGTGTCTTAGGTGCGCAGTGGCATGTCCACGTGTGTGTGATTGCACG
1770      1780      1790      1800      1810      1820      1830      1840
TGCCTGTGGGCCTGGGATAATGCCCATGGTACTCCATGCATTACCTGCCCTGTGCATGTCTGGACTCACGGAGCTCACC
1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920
CATGTGCACAAGTGTGCACAGTAAACGTGTTTGTGGTCAACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1930
AAAAAAAAAAAAAA

```

註) RT-PCR に用いたプライマーの位置を矢印で示した。5'側から順に、SN1(798-827)、SN2(894-923)、AS2(1055-1026)、AS1(1127-1098)である。但しAS1については5'端の2塩基はCTではなく、ゲノム由来のACを用いた。

【図 6】

その 1

10	20	30	40	50	60	70	80
GGCAGCCAGCGGCCTCAGACAGACCCACTGGCGTCTCTCTGCTGAGTGACCGTAAGCTCGGCGTCTGGCCCTCTGCCTGC							
90	100	110	120	130	140	150	160
CTCTCCCTGAGTGTGGCTGACAGCCACGCAGCTGTGTCTGTCTGTCTGCGGCCCGTGCATCCCTGCTGCGGCCCGCTGGT							
170	180	190	200	210	220	230	240
ACCTTCCTTGCCGTCTCTTTCTCTGTCTGCTGCTCTGTGGGACACCTGCCTGGAGGCCAGCTGCCCGTCATCAGAGTG							
250	260	270	280	290	300	310	320
ACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGACTCGGGCTGGGTGTGGATTCTCAGCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACC							
330	340	350	360	370	380	390	400
CTCATCTGTACCCCCACGCTGAACCCAGCTGCCACCCCCAGAAGCCCATCAGACTGCCCCAGCACACGGAATGGATT							
410	420	430	440	450	460	470	480
CTGAGAAAGAAGCCGAAACAGAAGGCCCGTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCTTGTCTCTGCTGCTGC							
M P R G W A A P L L L L L L							
490	500	510	520	530	540	550	560
TCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTACCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGG							
Q G G W G C P D L V C Y T D Y L Q T V I C I L E M W							
570	580	590	600	610	620	630	640
AACCTCCACCCAGCAGCTCACCTTACCTGGCAAGACAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCCACCTCCTGCAGCCT							
N L H P S T L T L T W Q D Q Y E E L K D E A T S C S L							
650	660	670	680	690	700	710	720
CCACAGGTGGGCCACAATGCCAGCATGCCACCTACACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATT							
H R S A H N A T H A T Y T C H M D V F H F M A D D I F							
M P R M P P T P A T W M Y S T S W P T T F							
730	740	750	760	770	780	790	800
TCAGTGTCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCAGGAGTGTGGCAGCTTTCTCCTGGCTGAGAGCAAGTCCGAG							
S V N I T D Q S G N Y S Q E C G S F L L A E S K S E							
S V S T S Q T S L A T T P R S V A A F S W L R A S P R							
810	820	830	840	850	860	870	880
GAGAAAGCTGATCTCAGTGGACTCAAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCGTGGAGTTCGCAAGACTCGAGCTATGAGCTGC							
E K A D L S G L K K C L P P P P G V P Q R L E L *							
R K L I S V D S R S V S L L P L E F R K D S S Y E L Q							
890	900	910	920	930	940	950	960
AGGTGCGGGCAGGGCCCATGCCTGGCTCCTCTACCAGGGGACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTAGACC							
V R A G P M P G S S Y Q G T W S E W S D P V I F Q T							

【図 6】

その 2

```

          970      980      990      1000      1010      1020      1030      1040
CAGTCAGAGGAGTTAAAGGAAGGCTGGAACCGTCACCTGCTGCTTCTCCTCCTGCTTGTGCATAGTCTTCATTCTGCCTT

O S E E L K E G W N P H L L L L L L L V I V F I P A F
          1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
CTGGAGCCTGAAGACCCATCCATTGTGGAGGCTATGGAAGAAGATATGGGCCCTCCCCAGCCCTGAGCGGTTCTTCATGC

W S L K T H P L W R L W K K I W A V P S P E R F F M P
          1130      1140      1150      1160      1170      1180      1190      1200
CCCTGTACAAGGGCTGCACCGGAGACTTCAAGAAATGGGTGGGTGCACCGCTTCACTGGCTCCAGCCTGGAGCTGGGACCC

L Y K G C S G D F K K W V G A P F T G S S L E L G P
          1210      1220      1230      1240      1250      1260      1270      1280
TGGAGCCAGAGGTGCCCTCCACCGTGGAGGTGTACAGCTGCCACCCAGCAGCCCTGTGGAGTGTGACTTCACCAG

W S P E V P S T L E V Y S C H P P S S P V E C D F T S
          1290      1300      1310      1320      1330      1340      1350      1360
CCCCGGGGACGAAGGACCCCCCGGAGCTACCTCCGCCAGTGGGTGGTCATTCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCC

P G D E G P P R S Y L R Q W V V I P P P L S S P G P Q
          1370      1380      1390      1400      1410      1420      1430      1440
AGGCCAGCTAATGAGGCTGACTGGATGTCCAGAGCTGGCCAGGCCACTGGGCCCTGAGCCAGAGACAAGGTCACCTGGGC

A S * *

          1450      1460      1470      1480      1490      1500      1510      1520
TGTGATGTGAAGACACCTGCAGCCTTTGGTCTCCTGGATGGGCCTTTGAGCCTGATGTTACAGTGTCTGTGTGTGTG

          1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600
CATATGTGTGTGTGCATATGCATGTGTGTGTGTGTGTCTTAGGTGCCAGTGGCATGTCCACGTGTGTGTGATT

          1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
GCACGTGCCTGTGGGCCTGGGATAATGCCATGGTACTCCATGCATTCACTGCCCTGTGCATGTCTGGACTCAGGAGC

          1690      1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760
TCACCATGTGCACAAGTGTGCACAGTAAACGTGTTTGTGGTCAACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

          1770      1780
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

註) 2つの可能な ORF を示した。

【図 7】

その 1

10	20	30	40	50	60	70	80
GGCAGCCAGCGCCTCAGACAGACCCACTGGCCTCTCTCTGCTGAGTGACCGTAAGCTCGGCGTCTGGCCCTCTGCCTGC							
90	100	110	120	130	140	150	160
CTCTCCCTGAGTGTGGCTGACAGCCACGCAGCTGTGTCTGTCTGTCTGCGGCCCGTGCATCCCTGCTGCGGCCCGCCTGGT							
170	180	190	200	210	220	230	240
ACCTTCCTTGGCGTCTCTTTCTCTGTCTGCTGCTCTGTGGGACACCTGCCTGGAGGCCAGCTGCCCGTTCATCAGAGTG							
250	260	270	280	290	300	310	320
ACAGGTCTTATGACAGCCTGATTGGTGAAGTCTGGGCTGGGTGTGGATTCTGACCCAGGCCTCTGCCTGCTTTCTCAGACC							
330	340	350	360	370	380	390	400
CTCATCTGTACCCCCACGCTGAACCAAGCTGCCACCCCCAGAAGCCCATCAGACTGCCCCAGCACACGGAATGGATTT							
410	420	430	440	450	460	470	480
CTGAGAAAGAAGCGAAACAGAAGGCCGTTGGGAGTCAGCATGCCGCGTGGCTGGGCCGCCCCCTTGCTCCTGCTGCTGC							
M P R G W A A P L L L L L L							
490	500	510	520	530	540	550	560
TCCAGGGAGGCTGGGGCTGCCCGACCTCGTCTGCTACACCGATTACCTCCAGACGGTCATCTGCATCCTGGAAATGTGG							
Q G G W G C P D L V C Y T D Y L Q T V I C I L E M W							
570	580	590	600	610	620	630	640
AACCTCCACCCAGCAGCTCACCTTACCTGGCAAGACCAGTATGAAGAGCTGAAGGACGAGGCCACCTCCTGCAGCCT							
N L H P S T L T L T W Q D Q Y E E L K D E A T S C S L							
650	660	670	680	690	700	710	720
CCACAGGTCCGGCCACAATGCCAGCATGCCACCTACACCTGCCACATGGATGTATTCCACTTCATGGCCGACGACATTT							
H R S A H N A T H A T Y T C H M D V F H F M A D D I F							
730	740	750	760	770	780	790	800
TCAGTGTCAACATCACAGACCAGTCTGGCAACTACTCCAGGAGTGTGGCAGCTTTCTCCTGGCTGAGAGCATCAAGCCG							
S V N I T D Q S G N Y S Q E C G S F L L A E S I K P							
810	820	830	840	850	860	870	880
GCTCCCCCTTTCAACGTGACTGTGACCTTCTCAGGACAGTATAATATCTCCTGGCGCTCAGATTACGAAGACCCTGCCTT							
A P P F N V T V T F S G Q Y N I S W R S D Y E D P A F							
890	900	910	920	930	940	950	960
CTACATGCTGAAGGGCAAGCTTCAGTATGAGCTGCAGTACAGGAACCGGGAGACCCCTGGGCTGTGAGTCCGAGGAGAA							
Y M L K G K L Q Y E L Q Y R N R G D P W A V S P R R K							
970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
AGCTGATCTCAGTGGACTCAAGAAGTGTCTCCCTCCTCCCCCTGGAGTTCCGCAAAGACTCGAGCTATGAGCTGCAGGTG							
L I S V D S R S V S L L P L E F R K D S S Y E L Q V							
1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120
CGGGCAGGGCCCATGCCTGGCTCCTCCTACAGGGGACCTGGAGTGAATGGAGTGACCCGGTCATCTTTCAGACCCAGTC							
R A G P M P G S S Y Q G T W S E W S D P V I F Q T Q S							
1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AGAGGAGTTAAAGGAAGGCTGGAACCTCACCTGCTGCTTCTCCTCCTGCTTGTTCATAGTCTTCATTCTGCCTTCTGGA							

【図7】

その2

E	E	L	K	E	G	W	N	P	H	L	L	L	L	L	L	V	I	V	F	I	P	A	F	W	S	
1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280																			
GCCTGAAGACCCATCCATTGTGGAGGCTATGGAAGAAGATATGGGCCGTCCCCAGCCCTGAGCGGTTCTTCATGCCCTG																										
L	K	T	H	P	L	W	R	L	W	K	K	I	W	A	V	P	S	P	E	R	F	F	M	P	L	
1290	1300	1310	1320	1330	1340	1350	1360																			
TACAAGGGCTGCAGCGGAGACTTCAAGAAATGGGTGGGTGCACCCCTTCACTGGCTCCAGCCTGGAGCTGGGACCCCTGGAG																										
Y	K	G	C	S	G	D	F	K	K	W	V	Q	A	P	F	T	G	S	S	L	E	L	G	P	W	S
1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430	1440																			
CCCAGAGGTGCCCTCCACCCCTGGAGGTGTACAGCTGCCACCCACCACGGAGCCCGGCCAAGAGGCTGCAGCTCACGAGC																										
P	E	V	P	S	T	L	E	V	Y	S	C	H	P	P	R	S	P	A	K	R	L	Q	L	T	E	L
1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520																			
TACAAGAACCAGCAGAGCTGGTGGAGTCTGACGGTGTGCCAAGCCAGCTTCTGBCCGACAGCCAGAACTCGGGGGG																										
<u>Q E P A E L V E S D G V P K P S F W P T A Q N S G G</u>																										
1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600																			
TCAGCTTACAGTGAGGAGAGGGATCGGCCATACGGCCTGGTGTCCATTGACACAGTGACTGTGCTAGATGCAGAGGGGCC																										
<u>S A Y S E E R D R P Y G L V S I D T V T V L D A E G P</u>																										
1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680																			
ATGCACCTGGCCCTGCAGCTGTGAGGATGACGGCTACCCAGCCCTGGACCTGGATGCTGGCCTGGAGCCAGCCAGGCC																										
<u>C T W P C S C E D D G Y P A L D L D A G L E P S P G L</u>																										
1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760																			
TAGAGGACCCACTCTTGGATGCAGGGACACAGTCTGTCTGTGGCTGTGTCTCAGCTGGCAGCCCTGGGCTAGGAGGG																										
<u>E D P L L D A G T T V L S C G C V S A G S P G L G G</u>																										
1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840																			
CCCCTGGGAAGCCTCCTGGACAGACTAAAGCCACCCCTTGACATGGGGAGGACTGGGCTGGGGGACTGCCCTGGGGTGG																										
<u>P L G S L L D R L K P P L A D G E D W A G G L P W G G</u>																										
1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920																			
CCGGTCACCTGGAGGGGCTCTCAGAGAGTGAGGCGGGCTCACCCCTGGCCGGCCTGGATATGGACACGTTTGACAGTGGCT																										
<u>R S P G G V S E S E A G S P L A G L D M D T F D S G F</u>																										
1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000																			
TTGTGGGCTCTGACTGCAGCAGCCCTGTGGAGTGTGACTTCACAGCCCGGGGACGAAGGACCCCCCGGAGCTACCTC																										
<u>V G S D C S S P V E C D F T S P G D E G P P R S Y L</u>																										
2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080																			
CGCCAGTGGGTGGTATTCTCCGCCACTTTCGAGCCCTGGACCCAGGCCAGCTAATGAGGCTGACTGGATGTCCAGAG																										
<u>R Q W V V I P P P L S S P G P Q A S * *</u>																										
2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160																			
CTGGCCAGGCCACTGGGCCCTGAGCCAGAGACAAGTACCTGGGCTGTGATGTGAAGACACCTGCAGCCTTTGGTCTCC																										
2170	2180	2190	2200	2210	2220	2230	2240																			

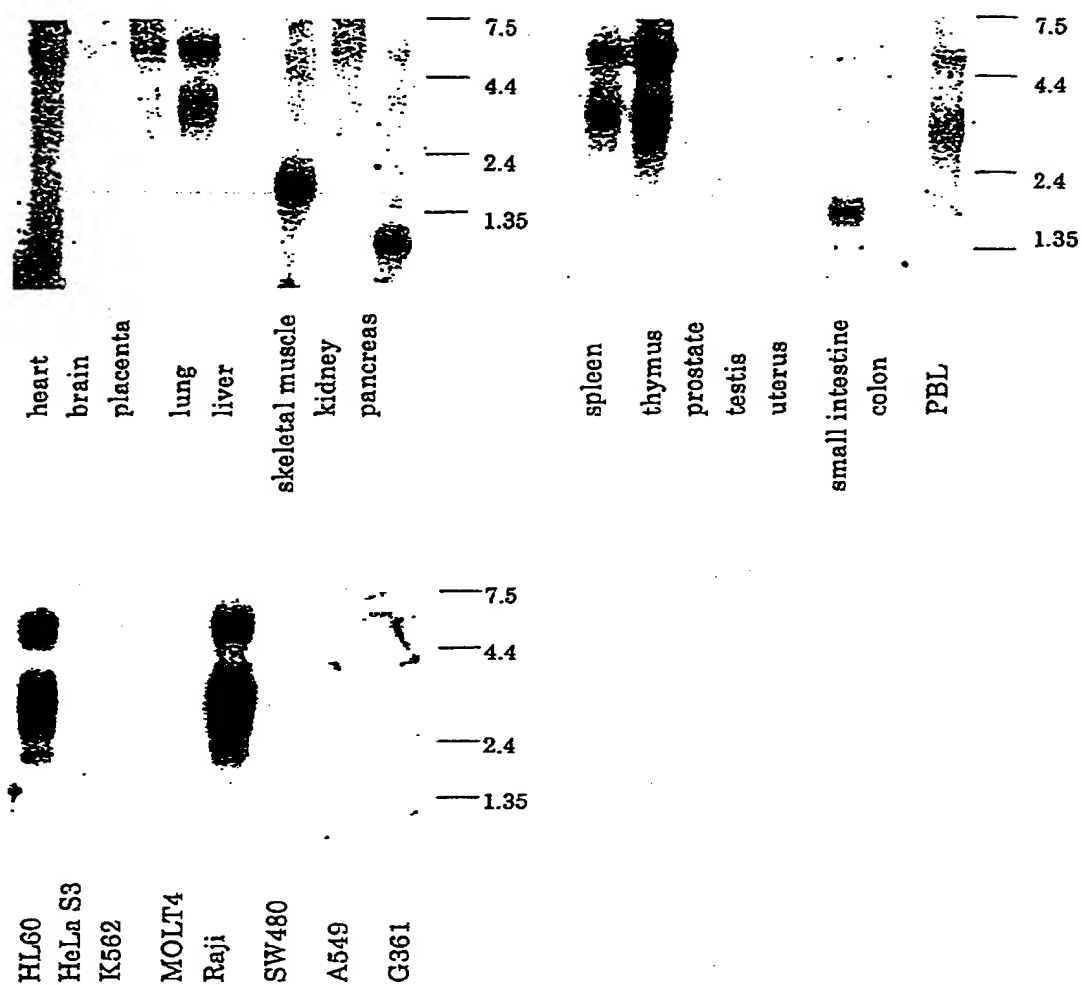
【図 7】

その 3

TGGATGGGCCTTTGAGCCTGATGTTACAGTGTCTGTGTGTGTGTGCATATGTGTGTGTGTGCATATGCATGTGTGTGTG
 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
 TGTGTGTGTCTTAGGTGCGCAGTGGCATGTCCACGTGTGTGTGATTGCACGTGCCTGTGGGCCTGGGATAATGCCCATGG
 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TACTCCATGCATTACCTGCCCTGTGCATGTCTGGACTCACGGAGCTCACCCATGTGCACAAGTGTGCACAGTAAACGTG
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480
 TTTGTGGTCAACAGAA

註) オルタナティブスプライシングにより挿入される 177 アミノ酸に下線を施した。

【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な蛋白質及びそれをコードする遺伝子、並びにその用途の提供。

【解決手段】 配列番号：1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質又は、配列番号：1に示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修正されたアミノ酸配列を有する蛋白質、それをコードする遺伝子、該蛋白質の製造方法及び用途。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

596102791

【住所又は居所】

茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2

【氏名又は名称】

株式会社中外分子医学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[596102791]

1. 変更年月日

1996年 7月15日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名

株式会社中外分子医学研究所